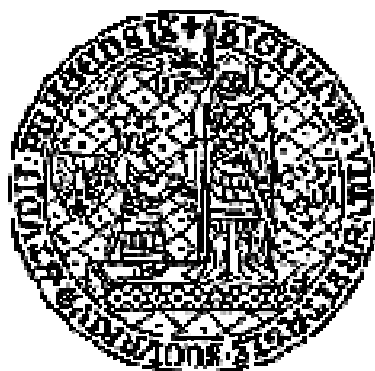


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Tomáš Urban

Studium sekundárních metabolitů houby *Geomyces destructans*

Study on secondary metabolites of fungus *Geomyces destructans*

Bakalářská práce

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru GAČR
P506/12/1064

Prohlášení

Tato bakalářská práce byla vypracována na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v laboratoři genetiky a metabolismu hub.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Miroslava Fliegera, CSc. a konzultantky RNDr. Evy Stodůlkové, a že jsem všechny použité informační zdroje řádně citoval. Tato práce nebyla použita k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Mikrobiologický ústav AV ČR a Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu obou institucí.

V Praze dne

.....

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem sekundárních metabolitů produkovaných houbou *Geomyces destructans*, kmen CCF 3941. Tato houba způsobuje u netopýrů onemocnění tzv. Syndrom bílého nosu. Její masivní výskyt byl zaznamenán během krátké doby v několika státech Severní Ameriky.

Ze stacionární kultivace houby *G. destructans* byly extrakcí rozpouštědly s různou polaritou připraveny surové extrakty. Cílem bylo dosáhnout maximální výtěžnosti produkovaných sekundárních metabolitů a to jak z biomasy tak i fermentační tekutiny. Hrubé extrakty byly dále purifikovány různými chromatografickými metodami: sloupcovou chromatografií, SPE a RP-HPLC. Z fermentační tekutiny byly izolovány dva metabolity (V14 a V17) a z houbové biomasy dvě hlavní látky C5 a C17.

U dichlormethanových a ethylacetátových extraktů získaných z fermentačního média byla antimikrobiální aktivita pozorována pouze proti baktérii *Kocuria rhizophila*.

Toluenové extrakty z houbové biomasy a z nich získané frakce A-E, C17 vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným mikrobiálním kulturám tj. *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* a *Kocuria rhizophila*. Navíc toluenový extrakt z biomasy *G. destructans* a z něho izolovaná frakce C5 vykazovaly na lidských kožních buňkách a také na Hela buňkách velmi podobnou biologickou aktivitu. Buňky ztrácely adhezi a jejich aktinový cytoskelet byl remodelován.

Klíčová slova:

Geomyces destructans, SPE, RP-HPLC

Předmětová hesla:

sekundární metabolity, mikrobiální aktivita

Abstract

This bachelor's thesis deals with the study on secondary metabolites produced by the fungus *Geomyces destructans*, strain CCF 3941. This fungus infected bats and causes them chronic disease called White Nose Syndrome. In a short period of time its massive occurrence was recorded at several states of North America.

From the stationary cultivation of fungi *G. destructans* the raw extracts were prepared by different polarity of solvents with the maximal yield of produced secondary metabolites from both the biomass and the fermentation liquid. The raw extracts have been further purified by variety of chromatographic methods: column chromatography, SPE and RP-HPLC. Two metabolites (V14 and V17) were isolated from the fermentation liquid and two main substances C5 and C17 from the fungal biomass.

Dichloromethane and ethyl acetate extracts obtained from the fermentation medium showed antimicrobial activity just only against the bacteria *Kocuria rhizophila*.

Toluene extracts obtained from fungal biomass and the isolated fractions A-E, C17 from them, have proved antimicrobial activity against all tested microbial cultures, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Kocuria rhizophila*. In addition to it, the toluene extract from biomass *G. destructans* and its isolated fraction C5 showed very similar pattern of biological activity on both human dermal and also on Hela cells, as well. The cells used to lose their adhesion and actin cytoskeleton was remodeled.

Key words:

Geomyces destructans, SPE, RP-HPLC

Subject heading:

Secondary metabolites, bioassay test

Poděkování

Úvodem bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Miroslavu Fliegerovi, CSc., své konzultantce RNDr. Evě Stodůlkové, Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, PhD., a také dalším vědeckým pracovníkům Mikrobiologického ústavu AV ČR za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také svým rodičům, celé rodině i přátelům za jejich podporu.

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Cíl práce	10
3 Teoretická část	11
3.1 Dermatofyti.....	11
3.2 Syndrom bílého nosu.....	11
3.3 <i>Geomyces destructans</i>	12
3.4 Sekundární metabolity	12
3.5 Extrakce sekundárních metabolitů	13
3.5.1 Extrakce kapalina-kapalina	13
3.5.2 Extrakce na pevné fázi	13
3.6 Chromatografie	14
3.6.1 Účinnost chromatografické separace.....	14
3.6.2 Tenkovrstvá chromatografie	16
3.6.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	16
3.6.4 Vysoce účinná chromatografie s obrácenou fází	17
3.6.5 Ultra účinná kapalinová chromatografie.....	17
3.7 Hmotnostní spektrometrie	18
3.8 UV-VIS spektrofotometrie	18
3.9 Vakuová odparka	19
4 Experimentální část.....	20
4.1 Instrumentace.....	20
4.2 Chemikálie.....	21
4.3 Kultivační média	22
4.4 Kultivace houby <i>Geomyces destructans</i>	22
4.5 Příprava fermentačního tekutiny a mycelia pro extrakci	23
4.6 Extrakce sekundárních metabolitů	23
4.7 Izolace sekundárních metabolitů.....	24
4.8 Spektrofotometrická měření.....	24
4.9 Analytické a semipreparativní HPLC.....	25
4.10 UPLC/DAD/MS.....	25
4.11 FTMS.....	26
4.12 Houbová biomasa (mycelium)	26
4.12.1 Extrakce mycelia	26
4.12.2 Izolace.....	27

4.13 Testování mikrobiální aktivity	27
4.14 Testování aktivity na savčích buňkách	27
5 Výsledky	28
5.1 UV-VIS měření	28
5.2 TLC	30
5.3 HPLC	32
5.4 UPLC	35
5.5 FTMS	39
5.6 Antimikrobiální aktivita	41
5.7 Testování aktivity na lidských kožních fibroblastech a buňkách HeLa	43
6 Závěr	45
7 Použitá literatura	47

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
a.m.u.	(z angl. „atomic mass units“)
AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. „bovine serum albumin“)
c	koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
C18	oktadecyl
C8	oktyl
CC	sloupcová chromatografie (z angl. „Column chromatography“)
DAD	detektor diodového pole (z angl. „Diode array detector“)
DAPI	4,6-diamidin-2-fenylindol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic acid“)
ESI	ionizace elektrosprejem
EtAc	ethylacetát
FTMS	Fourierova transformační hmotnostní spektrometrie (z angl. „Fourier transformation mass spectrometry“)
FWHM	(z angl. „Full width at half maximum“)
G ⁻	gramnegativní bakterie
G ⁺	grampozitivní bakterie
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „High-performance liquid chromatography“)
l	délka absorpčního prostředí (cm)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. „Liquid-liquid extraction“)
m/z	poměr hmotnost / náboj iontu
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass spectrometry“)
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. „Nuclear magnetic resonance“)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
ROS	reaktivní kyslíkové formy (z angl. „reactive oxygen species“)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází (z angl. reversed-phase HPLC)

rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina (z angl. „Ribosomal ribonucleic acid“)
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. „Solid-phase extraction“)
T	transmitance
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z angl. „Thin-layer chromatography“)
TOF	průletový analyzátor (z angl. „Time-of-flight“)
t_R	retenční čas
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „Ultra-performance liquid chromatography“)
UV-VIS	ultrafialové-viditelné záření (z angl. „Ultraviolet-Visible“)
v/v	poměr objemů
WNS	Syndrom bílého nosu (z angl. „White Nose Syndrome“)
ε	absorpční koeficient ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm}^{-2}$)

1 Úvod

Netopýři patří mezi nejrozmanitější a geograficky nejrozšířenější skupinu savců na Zemi. Hrají důležitou roli v ekosystému např. jako opylovači rostlin, při regeneraci lesů, v kontrolování hmyzí populace atd.[1]

Důležitou vlastností netopýřů je jejich zimní spánek, který přispívá k jejich výjimečně dlouhověkosti. Na druhé straně, je to právě zimní spánek, při kterém netopýři trpí značnou úmrtností. Příčinou mohou být nepříznivé životní podmínky jako mráz nebo záplavy, ale také lidské aktivity zahrnující návštěvy jeskyní a používání pesticidů.[2] Pokud jsou netopýři rušeni během zimního spánku jejich zásobní energie, kterou si nastřádali ve formě tukových zásob přes aktivní období, je vyčerpávána. Její zvýšená spotřeba tak ohrožuje jejich přežití.[3] Bez větší úmrtnosti přežívali netopýři po tři desítky let v oblasti státu New York v přírodní rezervaci. Od roku 2006 začalo vymírání netopýřů ve velkém měřítku. Tento fenomén se rozšířil během krátkého období i do ostatních států Severní Ameriky.[2]

Úbytek netopýřů byl alarmující, přestože žádné přírodní ani antropogenní události, které by mohly způsobovat jejich úmrtí, nebyly v těchto lokalitách hlášeny. U nemocných jedinců byl zjištěn bílý povlak na nose, podle kterého bylo toto onemocnění - Syndrom bílého nosu - pojmenováno. Infekce byla zkoumána u čtyř druhů netopýřů: netopýr hnědavý (*Myotis lucifugus*), netopýr severní dlouhouchý (*Myotis septentrionalis*), netopýr hnědý (*Eptesicus fuscus*) a netopýr tříbarevný (*Perimyotis subflavus*).[4] Důležitým průlomem ve výzkumech tohoto onemocnění byla izolace této zatím neznámé houby z poškozené netopýří tkáně. Na základě DNA sekvence byla tato houba určena jako nový druh *Geomyces destructans* a zařazena do skupiny psychrofilních (chladnomilných), keratolytických hub rodu *Geomyces*. [2,4]

Bylo by zajímavé zjistit jaký vliv houba *G. destructans* na netopýry má, jaké sekundární metabolity produkuje, jaká je jejich biologická aktivita a tudíž jakou úlohu by mohly v tomto ekosystému hrát.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo vypracovat postup extrakce sekundárních metabolitů houby *G. destructans* (kmen CCF 3941) z kultivačního média a houbové biomasy. Dále zjistit, které metody budou nejvhodnější pro izolaci jednotlivých látek a určení jejich struktur. Jednotlivé separační a purifikační kroky byly provázeny průběžným testováním biologické aktivity vůči mikrobiálním a savčím buňkám.

3 Teoretická část

3.1 Dermatofyti

Dermatofyti patří mezi mikroskopické houby napadající povrchové rohovějící vrstvy pokožky či nehty a vlasy, tj. mají keratofilní charakter. Dělí se do tří skupin, podle toho v jakém společenstvu se rozšiřují, tedy na antropofilní (kontaktem s lidmi), zoofilní (kontaktem se zvířaty) a geofilní druhy přenášené půdou. Ke svému růstu potřebují dlouhou inkubační periodu. Spóry přežívají i několik let a jejich odolnost vůči teplotě se zvyšuje, pokud jsou zachyceni na pokožce hostitele.[5,6]

3.2 Syndrom bílého nosu

Syndrom bílého nosu (z angl. White Nose Syndrome, WNS) je onemocnění, které ohrožuje více než 20 % netopýrů. Během čtyř let (do roku 2010) uhynulo více než jeden milion jedinců.[7] Situace je natolik závažná, že některým druhům netopýrů hrozí vyhynutí.

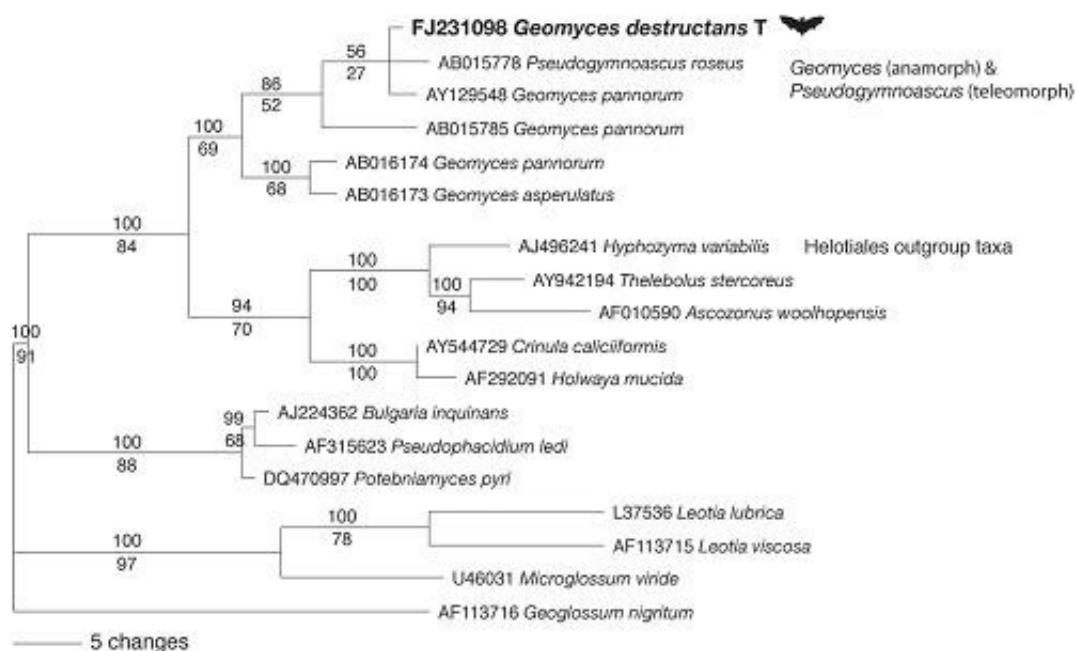
Poprvé byla choroba WNS zdokumentována během zimy roku 2006 v jeskyni Howes 52 km západně od Albany v New Yorku (USA). Během třech následujících let bylo onemocnění WNS potvrzeno ve více než 100 jeskyních v několika státech Severní Ameriky (př. Massachusetts, New Jersey atd.), dokonce až 500 km jižně od prvního nálezu (Virginie a na severu Tennessee).

Masivní výskyt tohoto onemocnění (bílý povlak na nose, uších a křídlech) byl zaznamenán výhradně na zimovištích a to v době jejich hibernace, tj. během zimního období (viz. Obr. 1).[7]



Obr. 1 – Netopýr hnědavý (*Myotis lucifugus*), WNS – bílý povlak.[8]

Vědecký tým Dr. Bleherta vyizoloval samotného původce WNS a následně ho identifikoval pomocí genové sekvence jako nový druh – *G. destructans* (viz. Obr. 2).[2,4]



Obr. 2 - Phylogenetická analýza rRNA genu malé ribozomální jednotky.[4]

3.3 *Geomyces destructans*

G. destructans patří mezi psychrofilní (chladnomilné) dermatofyty. Její optimální teplota růstu je 3-18 °C (podobné teplotní podmínky byly zjištěny na zimovištích během hibernace netopýrů), přičemž nejvyšší růstová intenzita byla zjištěna při 14 °C, při 20 °C je růst nulový a vyšší teploty houbu ničí. Typické pro tuto houbu jsou asymetricky zakřivené konidie, [9,10] nepohlavní, nepohyblivé spóry, které mohou být původcem šíření nákazy. [11] Její nejvíce geneticky příbuznou houbou je *G. pannorum*, nejhojnější půdní houba severní polokoule, která byla izolována z různých zdrojů např. půda či srst divokých savců.[9,10]

3.4 Sekundární metabolismy

Metabolismus můžeme popsat jako soubor biochemických reakcí, či metabolických drah, které probíhají v organismu. Dělíme je na dvě skupiny, primární a sekundární metabolismus. Primární metabolismus zahrnuje základní chemické přeměny, na kterých přímo závisí život a růst organismu. Tyto procesy jsou pro všechny živé organismy, anebo

alespoň pro jejich velkou skupinu, podobné např. metabolismus sacharidů, tuků, aminokyselin a nukleových kyselin.[12]

Sekundární metabolismus produkuje organické látky, které jsou pro danou fylogenetickou skupinu organismů unikátní. Mohou to být různé obranné látky, signální molekuly (hormony), pigmenty, atraktivní vůně, stavební molekuly vytvářející skelet organismu a podobně. Mohou mít také ekologickou povahu, např. slouží jako ochrana proti predátorům, parazitům a nemocem, nebo při mezidruhové kompetici. Některé našly široké uplatnění v lékařství např. jako antibiotika, v zemědělství (př. pesticidy) a jiných průmyslových odvětvích (barviva atd.).[13]

3.5 Extrakce sekundárních metabolitů

3.5.1 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce neboli vyluhování je metoda získávání látek z různých, většinou přírodních materiálů. Pro extrakci je velmi důležité rozpouštědlo. Rozpouštědlo by mělo co nejlépe rozpouštět extrahovanou složku, zatímco jeho rozpustnost v extrahovaném roztoku by měla být omezená a co nejmenší. Tato heterogenní směs dvou kapalných fází, mezi kterými dochází k výměně látky, tj. přestup extrahované složky z fáze bohaté na původní rozpouštědlo (např. fermentační tekutina) do fáze extrakčního činidla se urychluje intenzivním promícháváním směsi. Toto míchání trvá podle okolností 5 až 15 minut, výjimečně i déle, což je zpravidla postačující na dosažení prakticky rovnovážného stavu. Následně se fáze od sebe oddělí na základě různých hustot. Po přesušení, např. síranem sodným bezvodým, fázi bohatou na extrahovanou složku zakoncentrujeme do odparku.

Výběr vhodných rozpouštědel závisí na chemickém složení matrice a obsahovaných sekundárních metabolitech. Extrakce se provádí buď v jednom kroku pro menší časovou náročnost, nebo se využívá vícenásobné extrakce, při neznámém zastoupení sekundárních metabolitů v matrici, která vyžaduje větší časovou náročnost.[14,15,16]

3.5.2 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (z angl. „Solid phase extraction“, SPE) je rychlá, přesná a reprodukovatelná. SPE je používána pro zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění

nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení. Místo dvou nemísitelných kapalin, jako je tomu v případě extrakce kapalina-kapalina, využívá technika SPE sorbci na tuhou fázi, čímž je docílena silnější interakce analytu, než když je rozpuštěn v rozpouštědle.[14,15,17,18]

Metoda SPE využívá mnoho druhů sorbentů na bázi silikagelu, modifikovaného silikagelu a různé polymerní sorbenty.[17,18]

3.6 Chromatografie

Chromatografie je analytická metoda založená na separaci molekul, na základě jejich rozdílných fyzikálně-chemických vlastností (struktura, polarita, atd.). Separace molekul závisí na procesu opakovaného ustavování rozdělovacích rovnováh, mezi stacionární a mobilní fází. Molekuly vzorku, které mají silnější interakci se stacionární fází, jsou více zadržovány a putují kolonou pomalejší rychlostí, než ty se slabší interakcí. Mezi chromatografické metody patří mimo jiné např. tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie a kapalinová chromatografie.[19]

3.6.1 Účinnost chromatografické separace

Účinnost chromatografické separace udává schopnost separovat od sebe látky obsažené ve vzorku. Účinnost separace záleží především na vlastnostech kolony a na rychlosti průtoku mobilní fáze. Důležitější pro účinnost separace je velikost částic, jejich rovnoměrné rozložení a hustota pro náplňové kolony.

Účinnost separace je vyjádřena pomocí počtu teoretických pater kolony. Na každém teoretickém patru dochází k ustavení rovnovážné koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fází. Výška teoretického patra je vyjádřena výškovým ekvivalentem teoretického patra (H). Vyšší počet teoretických pater na jednotku délky znamená lepší separaci a vyšší rozlišení analytů.[20,21]

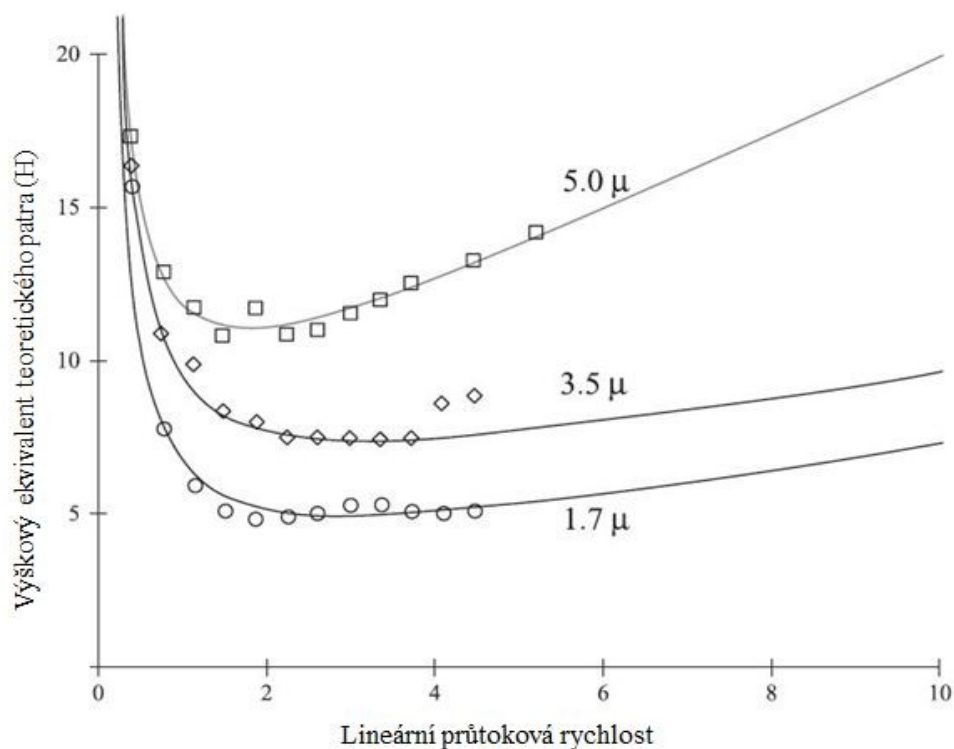
Účinnost kolony závisí také na dynamických vlastnostech (vířivá a molekulová difúze a odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi), které způsobují rozmývání naneseného analytu v mobilní fázi. Touto problematikou se zabývá van Deemterova rovnice (1), což je empirická formulace, která popisuje vztah mezi mírou rozmytí zón separovaných látek a výškou teoretického patra. Tato křivka (viz. Obr. 3) ukazuje, že při použití částic menších

jak 2 μm se výškový ekvivalent teoretického patra zvyšuje jen nepatrně, i za použití vyšších lineárních průtokových rychlostí.

$$(1) H = A + B/u + Cu$$

V rovnici (1) je H výškový ekvivalent teoretického patra, A , B a C jsou konstantami kolony (dynamické faktory, viz. výše) a u představuje lineární průtokovou rychlost mobilní fáze.[20,21]

Účinnost chromatografické separace lze tedy ovlivnit velikostí částic, lineární průtokovou rychlostí mobilní fáze, délkou kolony, a nebo výběrem vhodné mobilní fáze či rozpouštědla. V současné době je k dosažení lepší účinnosti využíváno především dvou technologií. První spočívá ve využívání částic s velikostí pod 2 μm (Ultra-účinná kapalinová chromatografie), které je provázeno značným zvýšením zpětného tlaku kolony a vyžaduje specifické instrumentální vybavení. Druhá je technologie přípravy částice s pevným jádrem, takzvané „core shell“, která nahrazuje používání částic s velikostí pod 2 μm . Na těchto kolonách lze dosáhnout stejných účinností separace bez negativního účinku na zpětný tlak (pracují za stejného zpětného tlaku jako náplňové kolony s částicemi kolem 5 μm).[20,21]



Obr. 3 – van Deemterova křivka, při různých velikostech částic.[20]

3.6.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (z angl. „Thin-layer chromatography“, TLC) patří mezi nízkonákladové a rychlé analytické metody. V principu jde o rozdělování jednotlivých látek mezi postupující pohyblivou (mobilní) fází a pevnou (stacionární) fází tenké vrstvy. Sorbent, stacionární fáze (obvykle silikagel, oxid hlinitý) je nanesen na vhodném inertním nosiči (hliníková fólie nebo sklo). Mobilní fází jsou organická rozpouštědla - tzv. vyvíjecí soustava.

Detekci barevných látek lze provádět vizuálně. Nebarevné látky jsou detekovány buď použitím chemických činidel (např. nástřik ninhydrinem pro zviditelnění aminokyselin, postřik kyselinou sírovou, atd.). Další možnou metodou detekce analytů na TLC deskách je využití jejich schopnosti adsorbovat UV světlo. Látky s touto schopností jsou potom detekovány jako barevné skvrny. Tuto vlastnost mají např. všechny aromatické organické sloučeniny (absorbci UV vykazuje benzenové jádro). Některé látky na TLC také fluoreskují (např. kyselina anthranilová a chinolindiony mají po ozáření UV výraznou fialovou fluorescenci, kys. salicylová fluoreskuje modře). Tato vlastnost však závisí na vlnové délce UV lampy a povaze fluorescenčního indikátoru dané TLC desky (uvedené údaje jsou vztaženy k vlnové délce 254 nm). Některé UV lampy mají kromě standardní vlnové délky 254 nm ještě vlnovou délku 366 nm. [14,16]

3.6.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „High-performance liquid chromatography“, HPLC) je pokročilou technikou kapalinové chromatografie, u které se začaly používat kolony naplněné stacionárními fázemi s velikostí částic 10 µm. Tím bylo dosaženo mnohem vyšší účinnosti separace oproti běžným náplňovým kolonám.[14]

Systém HPLC se skládá z těchto částí: kolony, ve které probíhá vlastní separace analytů, může být tvořena kovovou, či skleněnou trubicí, s ocelovým krytem, odolnou proti vysokým tlakům, naplněnou pevnými, porózními částicemi, v řádech mikrometrů; pumpy, která obstarává konstantní a kontinuální tok mobilní fáze systémem; zásobních roztoků; dávkovače, který v mnoha případech bývá již automatizován v podobě autosampleru, což dovoluje naprogramovat rozdílná množství vzorků, která jsou odebíraná z vialek a automaticky dávkována; detektoru, který zajišťuje kontinuální detekci látek procházejících

kolonou; sběrače dat a kontrolního systému, většinou v podobě počítače, který zajišťuje sběr dat a monitoruje systémové informace, jako jsou teplota, tlak a průtok mobilní fáze systémem.[20]

3.6.4 Vysoce účinná chromatografie s obrácenou fází

Chromatografie s obrácenou fází (z angl. „Reversed phase HPLC“, RP-HPLC) se stala jednou z nejpobulárnějších metod v chromatografii. Skoro 90% analýz s nízkomolekulárními vzorky se provádí právě technikou RP-HPLC. U chromatografie s obrácenou fází je polarita mobilní a stacionární fáze obrácená oproti chromatografii s normální fází. Stacionární fáze je tedy nepolární a mobilní fáze je polární. Při analýzách dochází k prodlužování retenčních časů málo polárních látek a naopak zkracování retenčních časů u látek polárních.[20]

K náplni kolon se většinou používá modifikovaný silikagel, nebo různé polymerní materiály jako jsou kopolymery divinylbenzenu a styrenu. Mezi nejběžněji používané chemicky modifikované adsorbenty patří silikagely s navázanými uhlovodíkovými substituenty např. oktadecyl (C18), oktyl (C8), fenyl a jiné. Jako mobilní fáze se u RP-HPLC nejčastěji používají vodné roztoky methanolu, acetonitrilu atd.[20]

3.6.5 Ultra účinná kapalinová chromatografie

Princip systému Ultra účinné kapalinové chromatografie (z angl. „Ultra-performance liquid chromatography“, UPLC) je podobný systému HPLC, ale na rozdíl od HPLC dosahuje UPLC vyššího rozlišení, tím i citlivosti detekce a zejména významné zkrácení doby analýzy. Vývojem se u HPLC snižovala velikost částic sorbentu a tím se zvyšovala účinnost kolony. Jakmile se dosáhlo částic menších než 2.5 μm , tak se výrazně zvýšila účinnost. Dosáhlo se možnosti zvyšování lineární průtokové rychlosti bez většího dopadu na účinnost. Použitím menších částic sorbentu, došlo k otevření nových možností, z čehož vyšla nová metoda UPLC. Hlavní nevýhodou vyplývající z použití malých částic je prudký nárůst zpětného tlaku a s tím spojené vyšší nároky na instrumentaci.[21]

3.7 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass spectrometry“, MS) se stala populární metodou, díky její citlivosti a také možnosti identifikování a studování struktur neznámých sloučenin.

Hmotnostní spektrometrie je založená na separaci iontů v elektrickém či magnetickém poli, která je ovlivňována poměrem molekulové hmotnosti k náboji (m/z) dané molekuly. Při hmotnostní analýze jsou nejdříve molekuly ionizovány a rozštěpeny na fragmenty, specifické pro každou látku. Existuje několik variant ionizace, např. chemická a iontová ionizace, či ionizace elektrosprejem (z angl. „Electrospray ionization“, ESI), kde dochází k emitování iontů do plynné fáze. Ionizované molekuly jsou následně separovány v analyzátoru, podle poměru jejich hmotnosti a náboje. V hmotnostním analyzátoru se rozdělují ionty o různé hmotnosti v prostoru (magnetický a kvadrupólový analyzátor) nebo v čase (průletový analyzátor, z angl. „Time of flight“, TOF). Detekce je následně prováděna fotonásobičem. Součástí MS je také vakuový systém, který slouží k minimalizaci reakcí mezi iontovými částicemi.[15,22]

3.8 UV-VIS spektrofotometrie

Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti je technikou, která měří míru interakce molekul s elektromagnetickým zářením. V UV-VIS oblasti má elektromagnetické spektrum vlnovou délku v rozsahu 190-700 nm a energii v rozsahu 150 až 400 kJ mol⁻¹. Energie tohoto záření slouží k vybuzení elektronů z jejich základních stavů do excitovaných stavů. Spektrum získáme z měřené absorbance záření, jako funkci jeho frekvence nebo vlnové délky. Když paprsek projde roztokem vzorku, část záření je absorbováno a část projde skrz vzorek. Poměr intenzity záření, které vstoupí do roztoku vzorku a které projde skrz, je definován, jako transmitance T . Absorbance je poté definována jako záporný logaritmus této transmitance. Absorbance závisí lineárně na koncentraci vzorku v roztoku. Lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací vzorku je definována Lambert-Beerovým zákonem (2).

$$(2) A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

V Lambert-Beerově zákoně figuruje absorbance A , která je přímo úměrná absorpčnímu koeficientu ε , koncentraci vzorku c a délce absorpčního prostředí l . [23,24]

Spektrofotometr obvykle disponuje dvěma zdroji záření: deuteriovou lampou, která emituje záření v oblasti UV, a halogenovou lampou pro viditelné záření. Záření prochází monochromátorem, následně kyvetou se vzorkem a poté je detekováno fotonásobičem či fotodiodou. Spektrofotometrické stanovení vzorků je velmi citlivé, nedestruktivní a vyžaduje pouze malé množství stanovovaného analytu.[23,24]

3.9 Vakuová odparka

Vakuová odparka je založená na destilační technice a využívá fyzikálního zákona, který udává, že odlišné složky roztoku, mají odlišný bod varu, a tak se mohou od sebe oddělit. Vakuová odparka se skládá z vakuového čerpadla, vodní lázně a destilační kolony, která je chlazená vodou, takže vstupující pára je kondenzována na kapalinu a stéká do zásobní baňky.[25, 26]

4 Experimentální část

4.1 Instrumentace

HPLC systém Waters (Milford, MA, USA):

- pumpa s 600E systémovou kontrolou
- autosampler 717
- duální absorpční UV detektor 2487
- program Empower 2 software
- kolona Gemini C18, 5 μ m, 110 Å, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex
- kolona Gemini C18, 5 μ m, 110 Å, 250 mm x 10 mm, Phenomenex

UPLC systém Waters (Milford, MA, USA):

- vysokotlaká pumpa Acquity UPLC Solvent Manager
- autosampler Acquity UPLC Solvent Manager
- termostat Acquity UPLC Column Heater/Cooler
- detektor diodového pole Acquity UPLC Diode Array Detector
- hmotnostní spektrometr Waters LCT Premier XE, s analyzátozem TOF a ionizací ESI
- program MassLynx V4.1 software
- kolona Acquity UPLC BEH 1,7 μ m C18, 50 mm x 2,1 mm, Waters, USA
(vzorky byly zpracovány RNDr. Terezou Tylovou, Ph.D.)

FTMS systém APEX-Ultra (Billerica, MA, USA):

- 9.4T super konduktivní magnet, (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)
- duální II iontový zdroj (Bruker Daltonics, Billerica, MA).
- program Data Analysis version 4.0 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA).
(vzorky byly zpracovány RNDr. Petrem Novákem, Ph.D.)

vakuová odparka Buchi, Švýcarsko:

- Vacuum pump V-700
- Vacuum controller V-855
- Rotavapor R-215

- Heating Bath B-491

centrifuga Beckman Coulter, J6-MI centrifige, USA (použita u Mgr. Leoše Valáška, Ph.D.)

spektrofotometr UV-VIS 1800, Shimadzu, Japonsko

malá centrifuga Schoeller Hettich, Rotina 35R, UK

SPE C18, SPE Si, Strata Phenomenex (1 g, 5 g), USA

VersaPack, Spherical – VersaFlash, Supelco Sigma, 23 x 110 mm (23 g), pressure 60 Pa,
průtoková pumpa - accu scilog fluid merering inc

4.2 Chemikálie

Rozpouštědla byla v laboratoři predestilována.

methanol (99,94 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

toluen (min. 99 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

ethylacetát (99,99 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

dichlormethan (min. 99 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

aceton (min. 99,5 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

hexan (min. 99 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

amoniak vodný roztok (25 %, 26 ± 1 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

síran sodný bezvodý (99,4 %, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

methanol HPLC-G (99,98 %, Chromservis, Praha, ČR)

Erlichovo činidlo (složení: roztok 96% ethanolu, 380 ml; p-dimethylaminobenzaldehyd, 4 g; koncentrovaná HCl, 80 ml)

4.3 Kultivační média

Glukózové médium pro kultivaci kmene *Geomyces destructans*: glukóza 20 g/l H₂O, Yeast extrakt 5 g/l H₂O, pH = 6.5 (upraveno NaOH)

Média pro testování biologických aktivit:

Baktérie - Beef extrakt 10 g/l H₂O, Pepton 10 g/l H₂O, NaCl 5 g/l H₂O, 20 g agar/l H₂O, pH = 7.2 (upraveno NaOH)

Kvasinka – Glukóza 40 g/l H₂O, Pepton 5 g/l H₂O, Yeast extrakt 5 g/l H₂O, 20 g agar/l H₂O, pH = 7.0 (upraveno NaOH)

(kultivační média a Petriho misky pro testování biologických aktivit připravovala RNDr. Milada Chudíčková)

4.4 Kultivace houby *Geomyces destructans*

Stacionární (emerzní) kultivace houby *G. destructans*, kmen CCF 3941, byla prováděna na glukózovém médiu v 500 ml Erlenmeyerových baňkách uzavřených zátkou z buničiny (viz. Obr. 4) v chladovém boxu, ve tmě a stálé teplotě 8 °C, po dobu dvou měsíců. Po dvou měsících kultivace porostlo mycelium celý povrch média. Tyto myceliové „disky“ byly chlupaté a bílé barvy (viz. Obr. 5). Fermentační tekutina měla barvu tmavě žluto-hnědou.



Obr. 4 – Kultivovaná houba *G. destructans*



Obr. 5 – Mycelium *G. destructans*



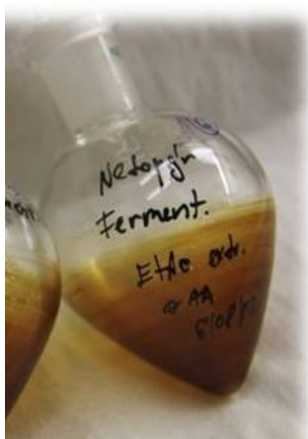
Obr. 6 - Fermentační tekutina po přesrážení acetonem

4.5 Příprava fermentační tekutiny a mycelia pro extrakci

Po kultivaci byla houbová biomasa oddělena od fermentační tekutiny pomocí pinzety a osušena na filtračním archu, poté zvážena a zamražena na -70°C . Fermentační tekutina byla centrifugována v plastových kyvetách po dobu 25 minut, při zrychlení 4000 G a teplotě 18°C . Supernatant, který měl slabě alkalické pH (7-8), byl přesrážen acetonem (v poměru 1:1, v/v), (viz. Obr. 6), s cílem odstranit vysokomolekulární látky (např. proteiny, polysacharidy). Následně byla fermentační tekutina filtrována a aceton z roztoku odpařen na vakuové odparce (teplota vodní lázně 45°C).

4.6 Extrakce sekundárních metabolitů

Extrakce sekundárních metabolitů z fermentační tekutiny byla prováděna sérií rozpouštědel se vzrůstající polaritou, pro maximální výtěžek, rozpouštědly v poměru 1:1 (v/v): hexan (později vynechán, z důvodu velmi malé výtěžnosti extrahované látky), dichlormethan, ethylacetát a ethylacetát + NH_3 (pH upraveno na 11 pomocí 25% amoniaku), dříve použit také „kyselý“ ethylacetát (s 3% AA), místo ethylacetátu s NH_3 . Rozpouštědlo s extrahovanými látkami bylo odděleno od fermentační tekutiny v děliče, přesušeno bezvodým síranem sodným a zakonzentrováno na vakuové odparce. Vysušené extrakty byly skladovány v lednici (viz. Obr. 7).



Obr. 7 – Odparek ethylacetátového extraktu z fermentační tekutiny.

4.7 Izolace sekundárních metabolitů

První experimenty byly provedeny na sloupcové chromatografii s využitím Sephadexu LH 20, který byl smáčen v dichlormethanu. Dichlormethanový extrakt rozpuštěn ve stejném rozpouštědle, byl nanesen na sloupec a eluován dichlormethanem s krokovým gradientem methanolu (dichlormethan / methanol; 100:0; 8 : 0.1; 8 : 0.5; 8 : 2; 1 : 1 a nakonec 0 : 100; v/v). Bylo získáno 10 frakcí, které byly dále děleny na SPE C18 (1 g) kolonky. Kolonka byla smáčena v CH_3OH a poté v 5% CH_3OH ve vodě. Koncentrované frakce rozpuštěné v methanolu po nanesení na kolonku byly eluovány krokovým gradientem CH_3OH / destilovaná voda (5%, 10%, 50%, 80% a 100%; v/v). Frakce eluované 50%-100% CH_3OH byly zakoncentrovány na odparce a frakce eluovaná 10% CH_3OH byla zakoncentrována na speed vacu. Odparky byly proměřeny na UV-VIS spektrofotometru a dále analyzovány pomocí HPLC.

Ethylacetátové extrakty byly zpracovány pouze reverzní SPE C18 (5 g) metodou viz. výše.

4.8 Spektrofotometrická měření

Izolované frakce byly měřeny na spektrofotometru (Schimadzu) v methanolu v rozsahu vlnových délek 190 – 700 nm. Ze získaných spekter byla zjištěna dvě UV maxima, 260 a 350 nm. Tyto dvě vlnové délky byly použity pro detekci izolovaných frakcí na HPLC.

4.9 Analytické a semipreparativní HPLC

Získané frakce (rozpuštěné v CH₃OH) z SPE a CC byly měřeny na HPLC systému (Waters, Milford, MA) s duálním UV detektorem 2487 gradientovou elucí. Mobilní fáze C (5% CH₃OH ve vodě) a D (100% CH₃OH) byly sonikovány před analýzou 10 min a následně probublávány heliem 40 ml/min. Pro UV detekci byly použity dvě vlnové délky na základě získaných maxim z UV-VIS spekter – 260 a 350 nm. Kolona Gemini C18 (5 µm, 110 Å, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex) s předkolonkou byla použita pro analytické dělení s průtokem 1 ml/min. Gradient začínal na 30% D a za 20 min lineárně dosáhl 100% D, následovalo 5 min promytí kolony při 100% D a 10 min návrat na výchozí podmínky, tj. 30% D.

Semipreparativní HPLC (kolona s předkolonkou - Gemini C18 5 µm, 110 Å, 250 mm x 10 mm, Phenomenex) bylo použito k izolaci látek za izokratických podmínek (80% CH₃OH ve vodě) při vlnové délce 260 nm a průtoku 2 ml/min.

4.10 UPLC/DAD/MS

Izolované frakce ze semipreparativního HPLC byly měřeny na UPLC systému (Waters Acquity, ČR) metodou UPLC/DAD/TOF-MS. Mobilní fáze se skládala ze složky A (CHOOH v H₂O; 0,1 : 99,9 (v/v)) a B (ACN), vzorky byly měřeny gradientovou elucí, s počátečním složením mobilní fáze A 95 %, za 10 minut lineárně dosáhl 70 % A, následovalo promytí 100 % B po dobu 2 minut a návrat na počáteční podmínky. Použita byla kolona UPLC BEH C18 (1,7 µm, 50 mm x 2,1 mm, Waters, ČR), při teplotě 25 °C a průtokem mobilní fáze 0,4 ml/min. Vzorky byly dávkovány v objemu 1 µl a chlazeny na teplotu 10 °C, měřeny DAD detektorem v rozsahu vlnových délek od 200 do 600 nm. Hmotnostní detektor Waters LCT Premier XE s ortogonálně uspořádaným analyzátozem doby letu (TOF; Waters MS, Manchester, UK) a elektrosprejem (ESI) byl použit v režimu pozitivních i negativních iontů. Parametry pro měření byly nastaveny takto: napětí kuželu 40 V, napětí na sprejové kapiláře ± 2500 V, teplota bloku iontového zdroje 120 °C, teplota desolvatačního plynu (dusík) 350 °C, s průtokem plynu 800 l/h, s průtokem na vstupním kuželu 50 l/h. Spektra skenu byla měřena v rozsahu od 100 do 1600 m/z v pozitivním i negativním módu s rozlišením FWHM 10000. Čas skenu byl 0,1 s s časovou prodlevou 0,01 s mezi skeny. Kontinuální nástřik referenční látky (leucin-enkefalin) zajišťoval přesnost měřené hmotnosti.

4.11 FTMS

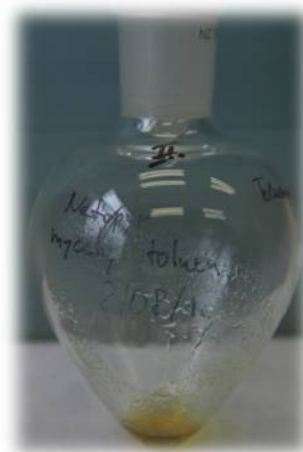
Izolované frakce proměřené na UPLC/MS, byly dále měřeny na Fourierově transformační hmotnostní spektrometrii (z angl. „Fourier transform mass spectrometry“, FTMS). Měřeno bylo na FTMS systému (9.4T, APEX-Ultra, Bruker Daltonics, Billerica, MA). Vzorky byly rozpuštěny v CH_3CN s vodou 9 : 1 (v/v), ionizovány elektrosprejem (ESI). Parametry pro měření byly následující: hodnota průtoku 1,5 l/min, teplota plynu (dusík) 230 °C. Spektra byla měřena v rozsahu od 150 do 1000 m/z, v pozitivním iontovém módu, s maximálním rozlišením FWHM 100000 při 400 m/z. Vzorek V17 izolován v prekurzoru iontu 243,5 m/z. Izolace byla prováděna v plynné fázi s 4,0 a.m.u. okně, s kolizní energií -11 V. Získané datové rozměry byly nastaveny na 1M bod, s hmotnostním rozsahem v m/z na 154 a.m.u. Čas jímání byl nastaven na 0,2 s, komora byla otevřena po dobu 0,009 s. Přístroj byl zevně kalibrován, s použitím jednotlivě nabitých skupin částic argininu. Stanovení bylo prováděno s přesností vyšší jak ppm. Pro hmotnostní spektra byl použit program Data Analysis version 4.0 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

4.12 Houbová biomasa (mycelium)

Houbová biomasa byla mechanicky odebrána a sušena na filtračním papíře. Po vysušení byla zvážena a uchována do dalšího zpracování při teplotě -70 °C. Váha mycelu se pohybovala v rozmezí 150 – 400 g. Rozmražené mycelium bylo rozkrájeno skalpelem na malé kousky a agarové bločky byly odstraněny.

4.12.1 Extrakce mycelia

Houbová biomasa/mycel byl extrahován sérií rozpouštědel se vzrůstající polaritou: toluen, ethylacetát, „kyselý“ ethylacetát (3% roztok AA) a nakonec methanol. Rozpouštědla byla přidávána v objemu 1 – 2 L a extrakce probíhala 1-3 hodiny ve tmě při pokojové teplotě. Potom bylo rozpouštědlo filtrováno na Büchnerově nálevce za sníženého tlaku, přesušeno bezvodým síranem sodným a zakoncentrováno na vakuové odparce. Takto získané odparky byly uloženy v lednici k dalšímu zpracování (viz. Obr 8).



Obr. 8 – Odparek toluenového extraktu z mycelia

4.12.2 Izolace

Vzhledem k tomu, že toluenový extrakt nebyl rozpustný v polárnějších rozpouštědlech např. EtAc nebo CH₃OH, nebylo možné jako v případě získaných extraktů z fermentační tekutiny použít reverzní dělení, jak na SPE, tak na HPLC. Pomocí TLC destiček byla hledána vhodná sestava rozpouštědel (toluen, hexan, dichlormethan, dichlorethan, ethanol, aceton a ethylacetát) pro vyvíjecí soustavu.

4.13 Testování mikrobiální aktivity

Mikrobiální aktivita byla testována na Petriho miskách s pevným agarovým médiem, se zaočkovanou kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*, a nebo s baktériemi - *Escherichia coli* (G⁻) či *Kocurii rhizophila* (G⁺). Do pevného kultivačního média se korkovrtem vytvořilo 6-8 jamek. Do jamek bylo pipetováno 20 µl extraktu, nebo kontrola = rozpouštědlo, ve kterém byl hrubý extrakt rozpustný. Poté se Petriho misky nechaly inkubovat přes noc v termoboxu, při teplotě 37 °C v případě bakterií (*E. coli* a *Kocurie rhizophila*) a při teplotě 30 °C u kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*). Druhý den ráno se prováděl odečet vytvořených inhibičních zón kolem jamek.

4.14 Testování aktivity na savcích buňkách

Lidské kožní fibroblasty a HeLa buňky byly testovány 20 hodin v přítomnosti jak frakcí připravených z toluenového extraktu tak v přítomnosti hrubého toluenového extraktu o různých koncentracích. Na posledních 10 min před fixací byl do média přidán mitotracker red ROS pro vizualizaci mitochondrií (červená). Buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem 20 min a poté permeabilizovány 1 min 0,1% Triton-X100. Aktinový cytoskelet byl barven 5000x ředěným roztokem phalloidinu-Alexa 488 s 1% BSA (zelená). Preparát byl uzavřen do mowiolu s DAPI – modrá jádra.

5 Výsledky

Z fermentační tekutiny z celkového objemu 10 L byly získány 3 extrakty: dichlormethanový extrakt s váhou 314 mg, EtAc extrakt - 183 mg a „kyselý“ EtAc extrakt - 103 mg, které byly dále testovány na antimikrobiální aktivity. Antimikrobiální aktivita byla zjištěna pouze proti *Kocurii rhizophila* u dichlormethanových a „kyselých“ ethylacetátových (3% roztok AA) extraktů. Na základě antimikrobiálních aktivit byly extrakty dále děleny na Sephadexu LH 20 a SPE C18.

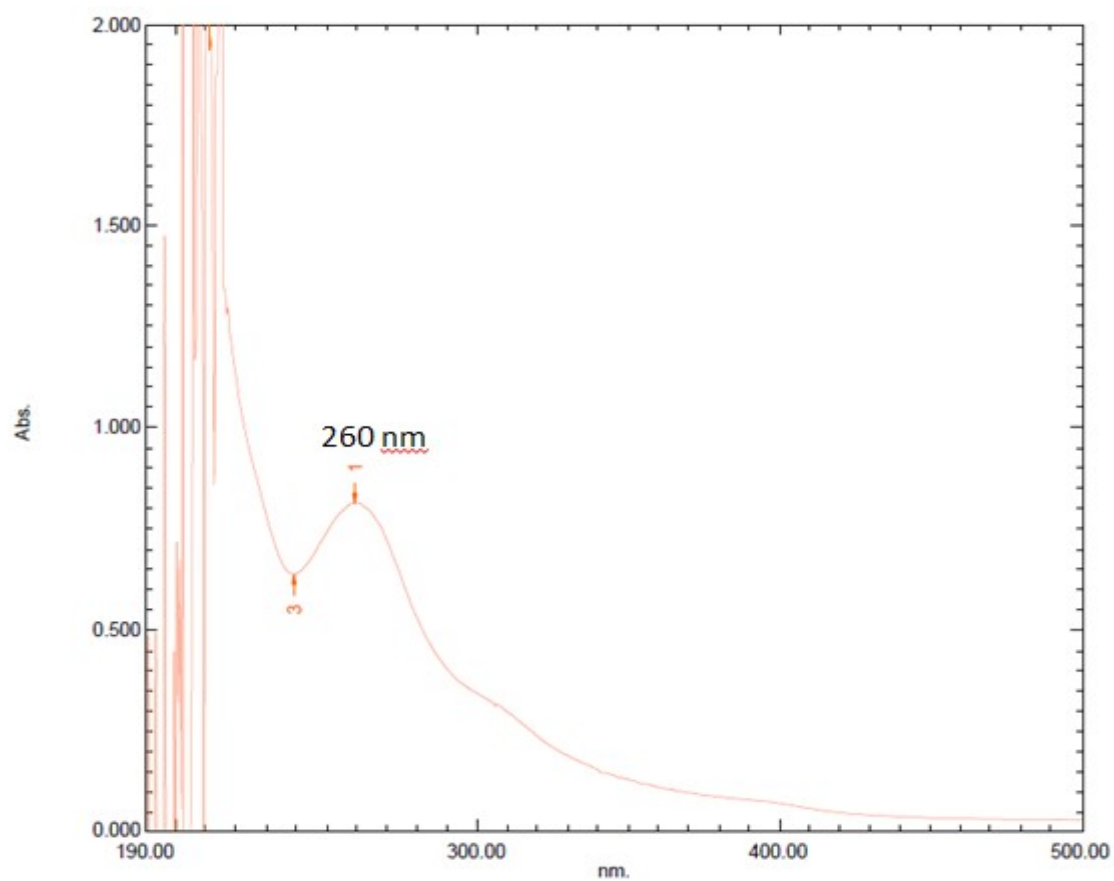
Hrubé extrakty získané z fermentační tekutiny byly dále měřeny na UV-VIS spektrofotometru. Z naměřených spekter byla určena dvě absorpční maxima (260 a 350 nm), která byla dále použita pro následné měření na HPLC.

Izolované vzorky ze semipreparativního HPLC byly dále měřeny na UPLC/MS (viz. kapitola 4.10) a FTMS (viz. kapitola 4.11), z kterých byla získána u dvou vzorků hmotnostní spektra a sumární vzorec u vzorku „V17“, z kterého byl v programu SciFinder nalezen jediný strukturní vzorec odpovídající přírodní sloučenině – lumichromu, který však neodpovídá vlastnostem vzorku V17.

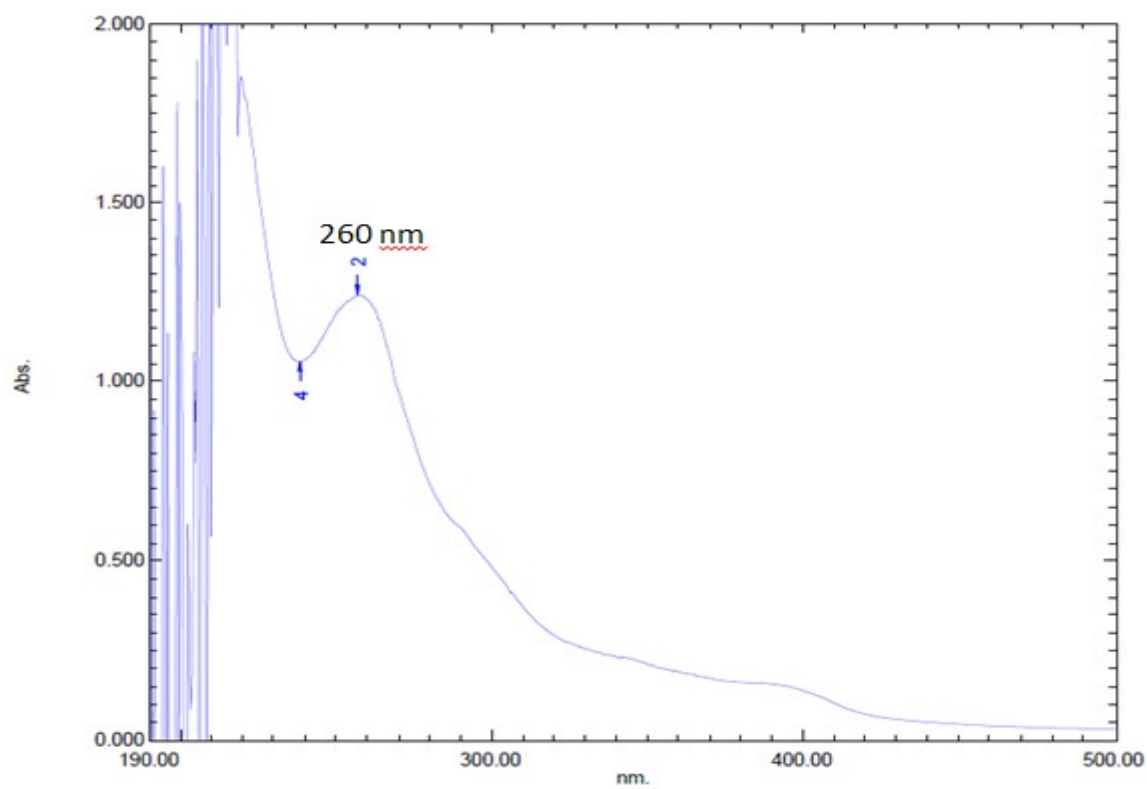
Z houbové biomasy o hmotnosti 377 g, bylo získáno 5 extraktů (2x toluenový, ethylacetátový, ethylacetátový „kyselý“ (3% roztok AA) a methanolový), přičemž toluenové extrakty vážily pouze 178 mg. Extrakty byly testovány na antimikrobiální aktivity. Aktivita byla prokázána pouze u toluenového extraktu. Na základě jeho aktivity byl toluenový extrakt dále dělen na SPE Si a získané frakce byly analyzovány pomocí TLC, z kterého byly patrné dvě hlavní látky „růžová“ a „žlutá“, na základě čehož byla jedna vybraná frakce (C) dále dělena na flash chromatografií. Izolovány byly dvě hlavní látky, C5 („růžová“) bez mikrobiální aktivity a C17 („žlutá“), která vykazovala antimikrobiální aktivitu. Vzorky byly testovány také na savčích buňkách, kde byla zjištěna aktivita frakce C5, na rozdíl od frakce C17.

5.1 UV-VIS měření

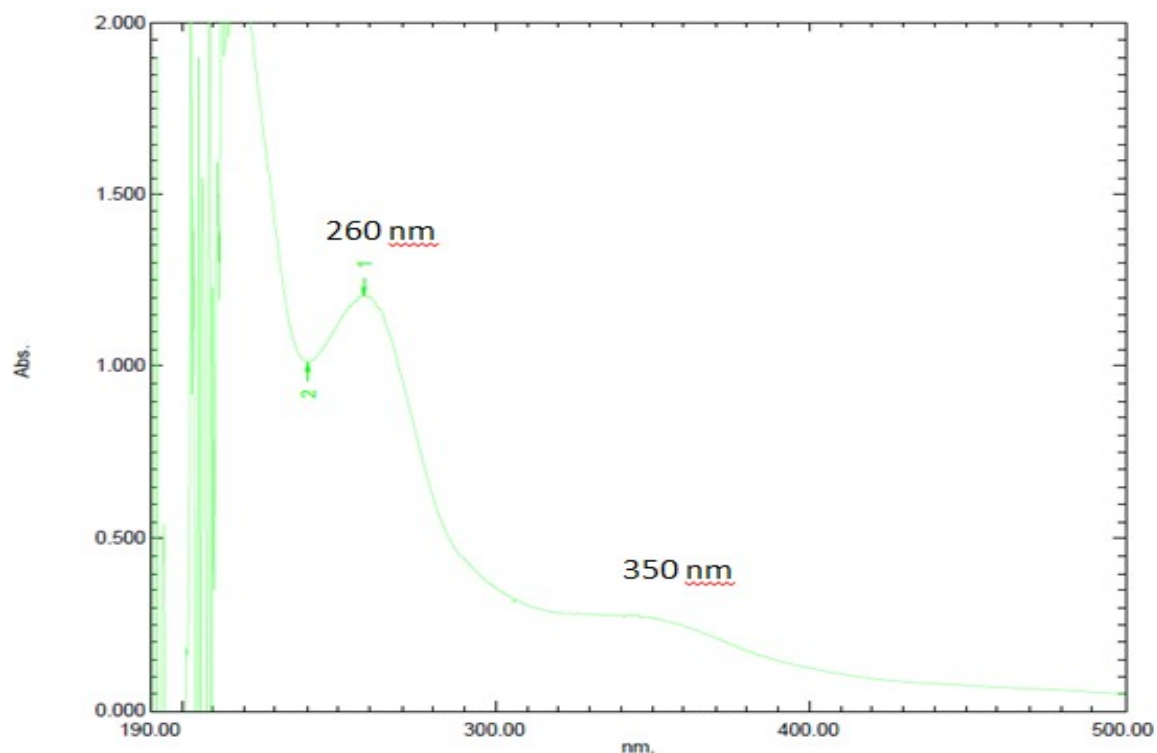
Z naměřených spekter (viz. kapitola 4.8) byly stanoveny dvě absorpční maxima (viz. obr. 9 a 10) 260 nm a méně intenzivní 350 nm (viz. obr. 11).



Obr. 9 – UV-VIS spektrum dichlormethanového extraktu z fementační tekutiny.



Obr. 10 – UV-VIS spektrum ethylacetátového extraktu z fementační tekutiny.



Obr. 11 – UV-VIS spektrum extraktu „kyselého“ ethylacetátu (3% AA) z fermentační tekutiny.

5.2 TLC

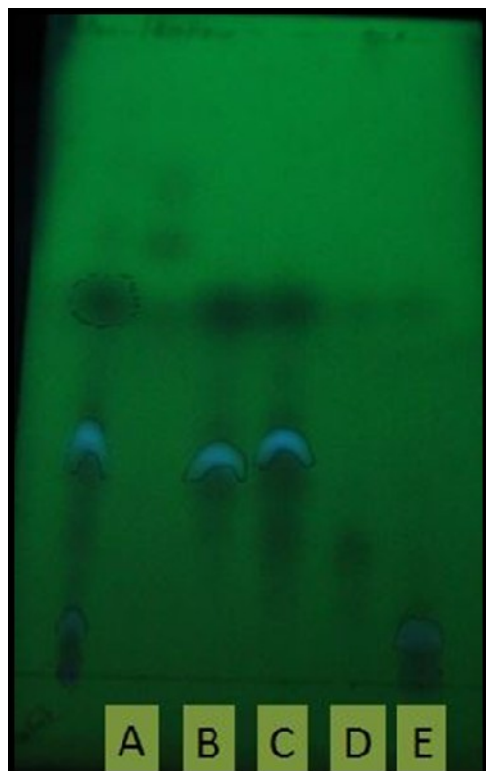
Extrakty získané z houbové biomasy byly zpracovány metodou TLC. Nejlepší výsledky byly dosaženy za použití vyvíjecí soustavy: toluen/aceton 10:1 (v/v). Pod UV lampou při vlnové délce 366 a 254 nm byly některé látky zbarvené modře, ale přímé hodnocení nebylo možné, protože většina látek nevykazovala žádné zbarvení. Z tohoto důvodu bylo nutné najít vhodné chemické činidlo pro zviditelnění skvrn. Postřík se prováděl Erlichovým činidlem (viz. Obr. 12).

Toluenový extrakt rozpuštěný v toluenu byl dělen na SPE Si (5g) kolonce smáčené v toluenu s krokovým gradientem acetonu (toluen/aceton; 10:0; 10:0.5; 10:1; 10:2; 1:1; a nakonec samotným acetonem; (v/v). Získané frakce A-E (viz. Obr. 13) byly naneseny na TLC desku, vyvíjeny v mobilní fázi toluen : aceton – 10:1 (v/v) a detekovány jak pod UV lampou (viz. Obr. 13, 14), tak pomocí Erlichova činidla. Následně frakce C, která obsahovala 2 hlavní

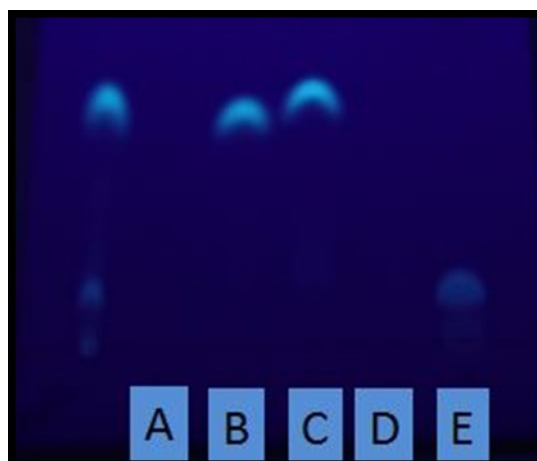


Obr. 12 – TLC toluenového extraktu z mycelia.

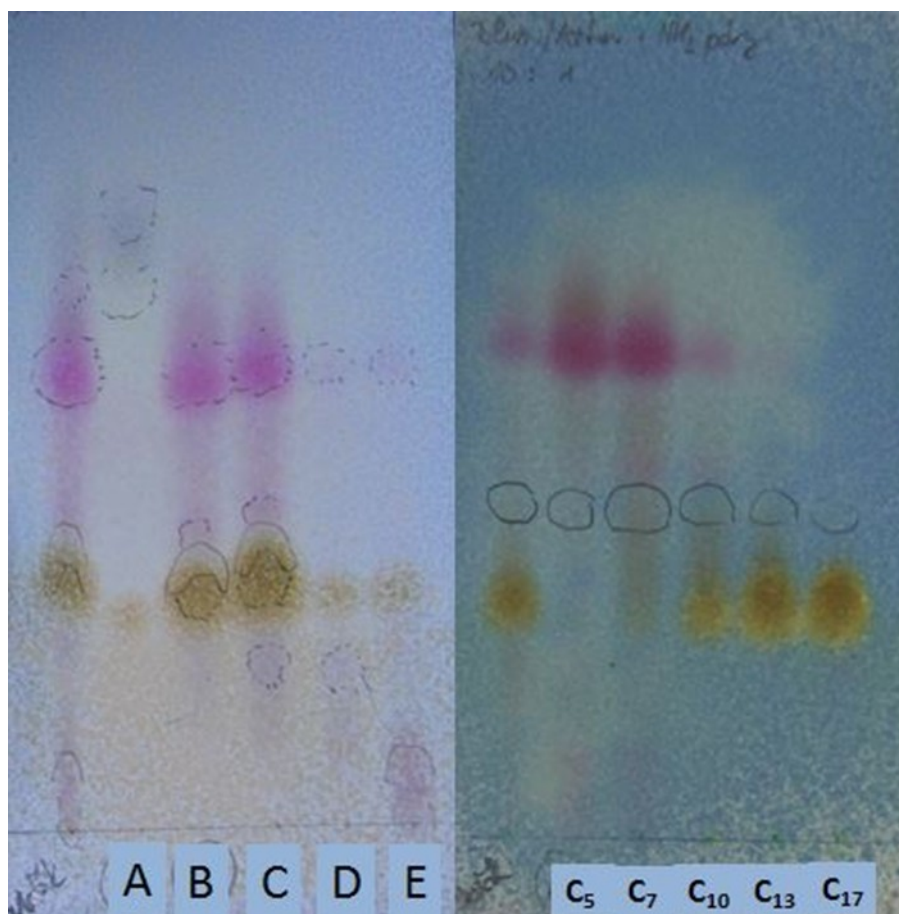
látky „růžovou“ a „žlutou“ ve stejném poměru, byla dále dělena na flash chromatografii. Frakce (C1-C35) byly na základě podobnosti TLC profilů spojeny a zakoncentrovány. Tímto postupem byly získány téměř čisté frakce dvou hlavních látek toluenového extraktu - C5 („růžová“) a C17 („žlutá“), viz. Obr. 15.



Obr. 13 – TLC SPE Si frakcí A-E
z toluenového extraktu mycelu,
UV detekce 254 nm.



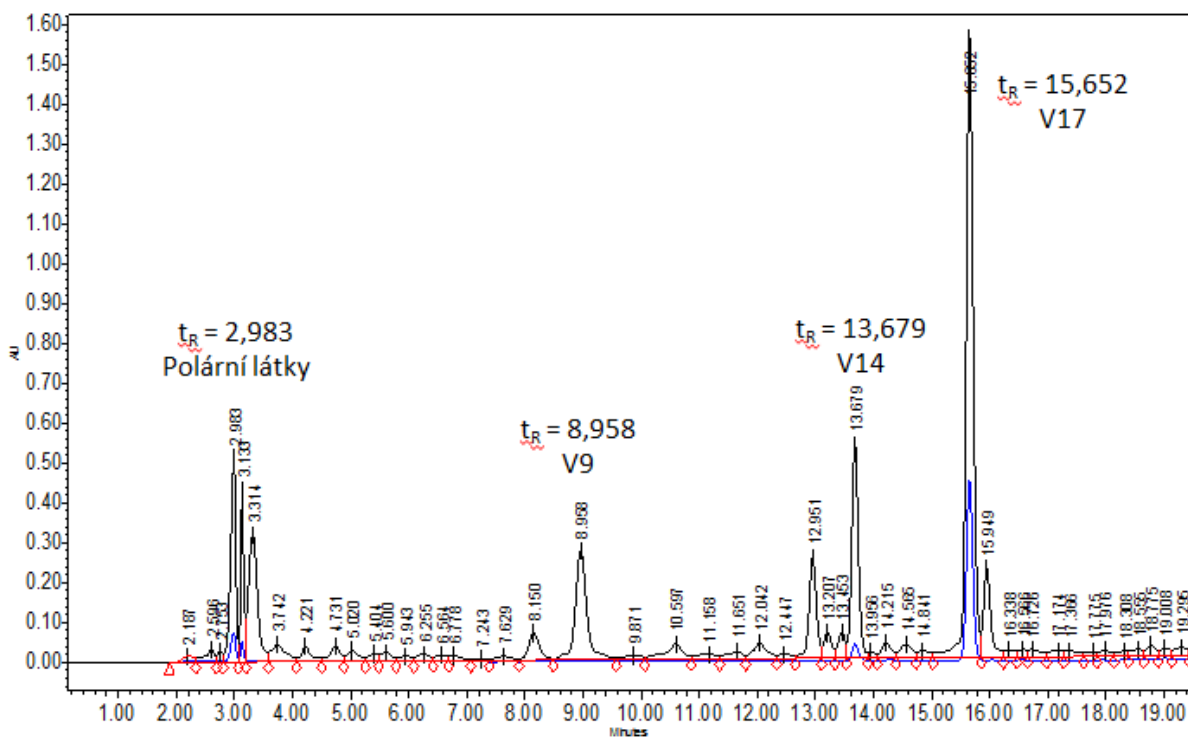
Obr. 14 – TLC SPE Si frakcí A-E
z toluenového extraktu mycelu, UV
detekce 366 nm.



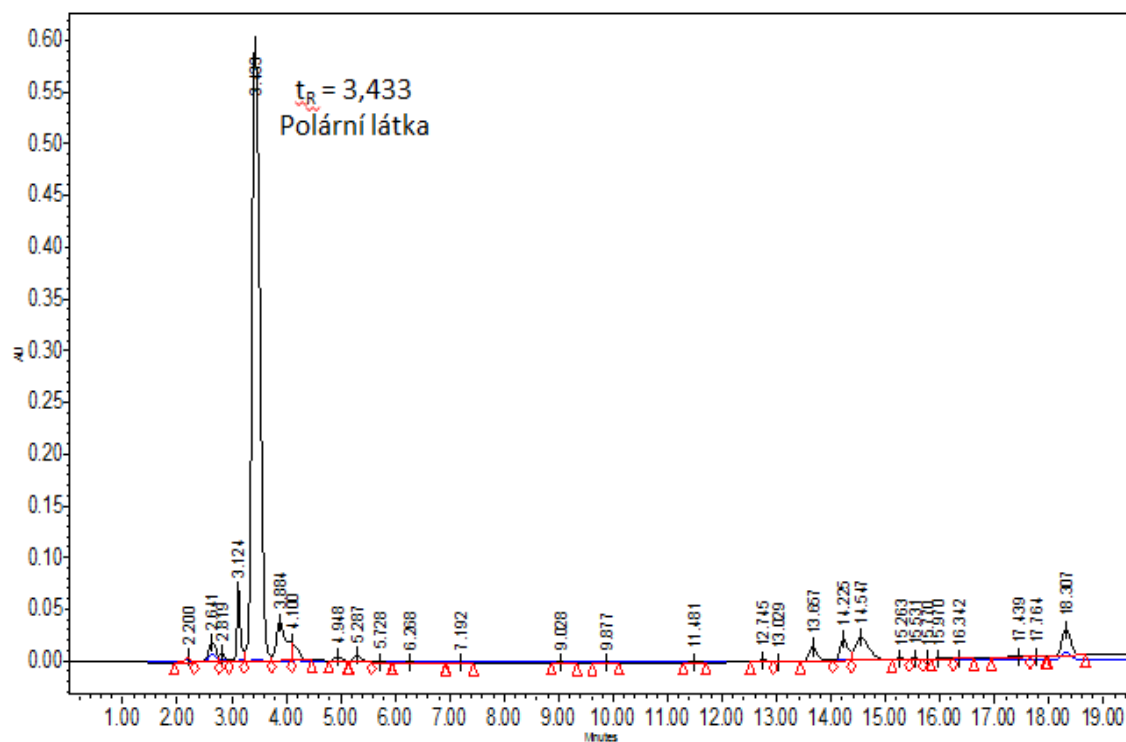
Obr. 15 – vlevo - TLC SPE Si frakcí A-E toluenového extraktu z mycelu a vpravo - TLC frakcí dělených na flash chromatografii C5-C17 z frakce C vlevo.

5.3 HPLC

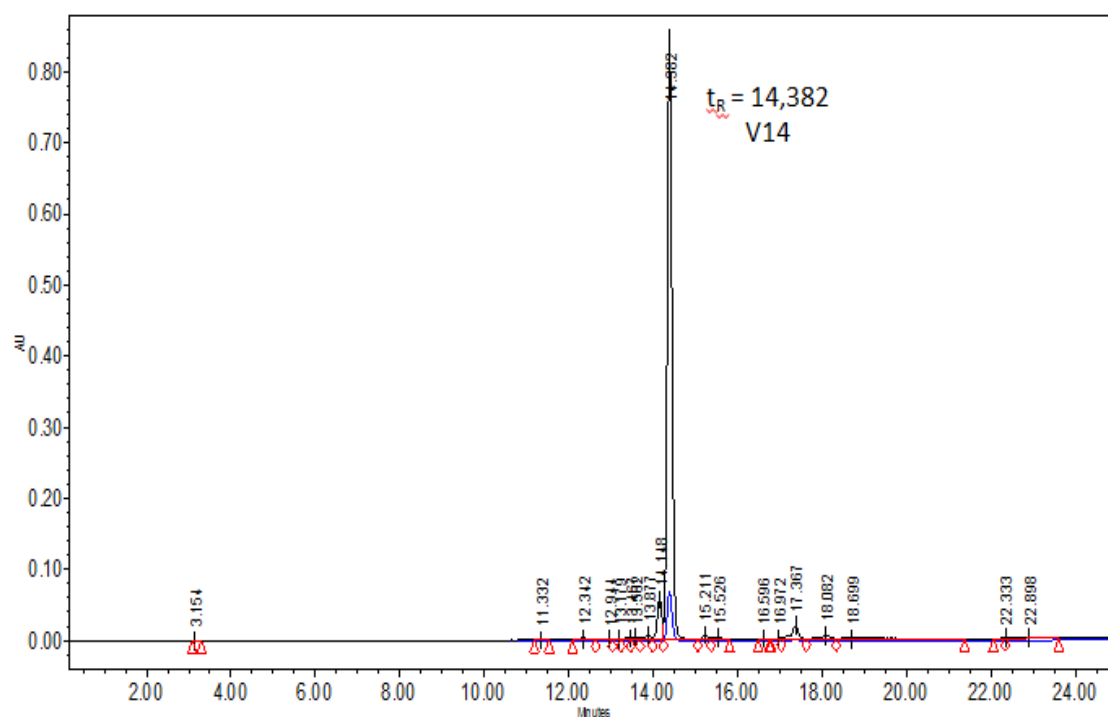
Pomocí HPLC byly měřeny hrubé extrakty získané z fermentační tekutiny (obr. 16,17). Látky nejvíce zastoupené v těchto extraktech se podařilo izolovat pomocí semipreparativního HPLC za izokratických podmínek (viz. kapitola 4.9). Byly připraveny dva standardy s technickými názvy „V14“ a „V17“ (viz. Obr. 18,19) pojmenovaných podle jejich retenčních časů na analytické koloně. Vzorek V14 měl retenční čas 14,38 minuty a čistotu 83,81 % (viz. Obr. 18), zatímco druhý vzorek V17 měl retenční čas 17,01 minuty a čistotu 90,97 % (viz. Obr. 19).



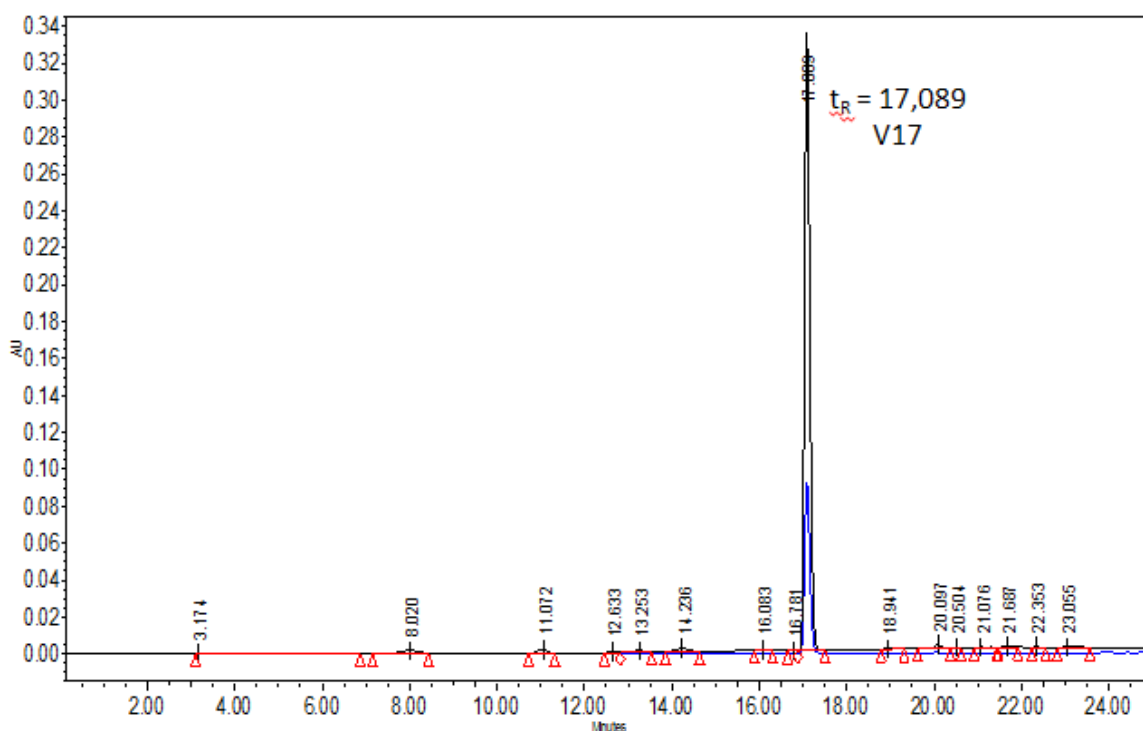
Obr. 16 - HPLC chromatogram dichlormethanového extraktu z fermentační tekutiny. Chromatografické podmínky: Kolona Gemini C18 (5 μ m, 110 Å, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex), průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 30 % D (CH₃OH) a 70 % C (5 % CH₃OH v H₂O) po 100 % D, lineárně za 20 min, detekce, UV 260 nm (černá) a 350 nm (modrá).



Obr. 17 - HPLC chromatogram „kyselého“ ethylacetátového (s 3% AA) extraktu z fermentační tekutiny, chromatografické podmínky viz. Obr. 16.



Obr. 18 - HPLC chromatogram vzorku „V14“, chromatografické podmínky viz. Obr. 16.

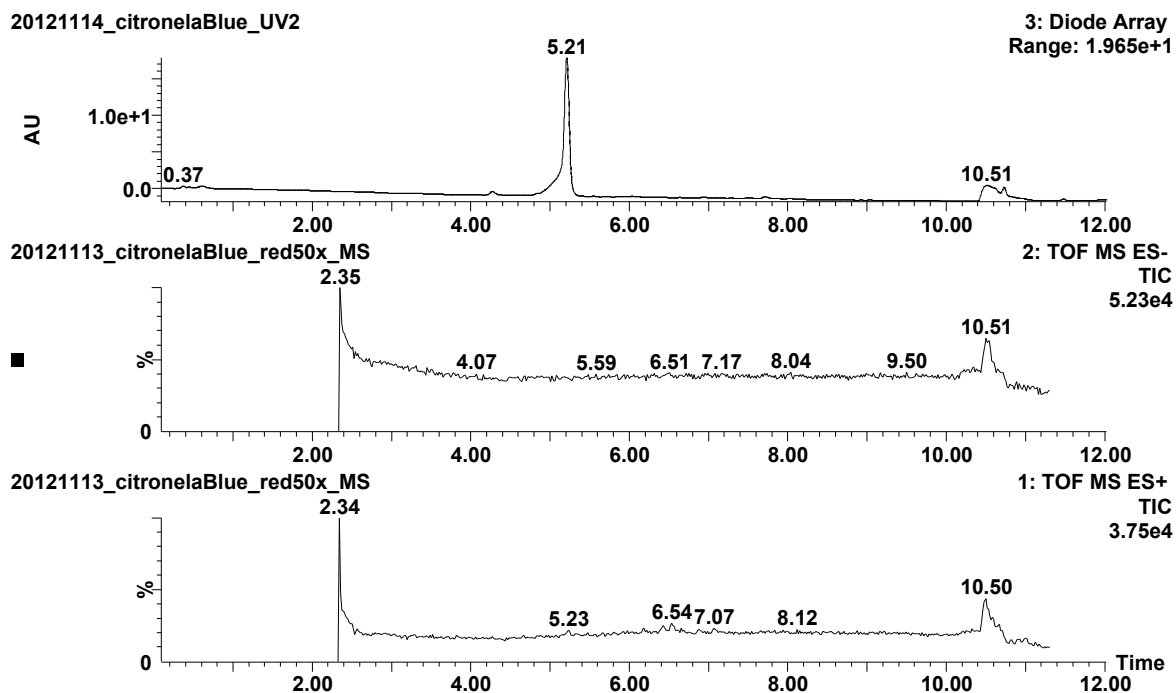


Obr. 19 - HPLC chromatogram vzorku „V17“, chromatografické podmínky viz. Obr. 16.

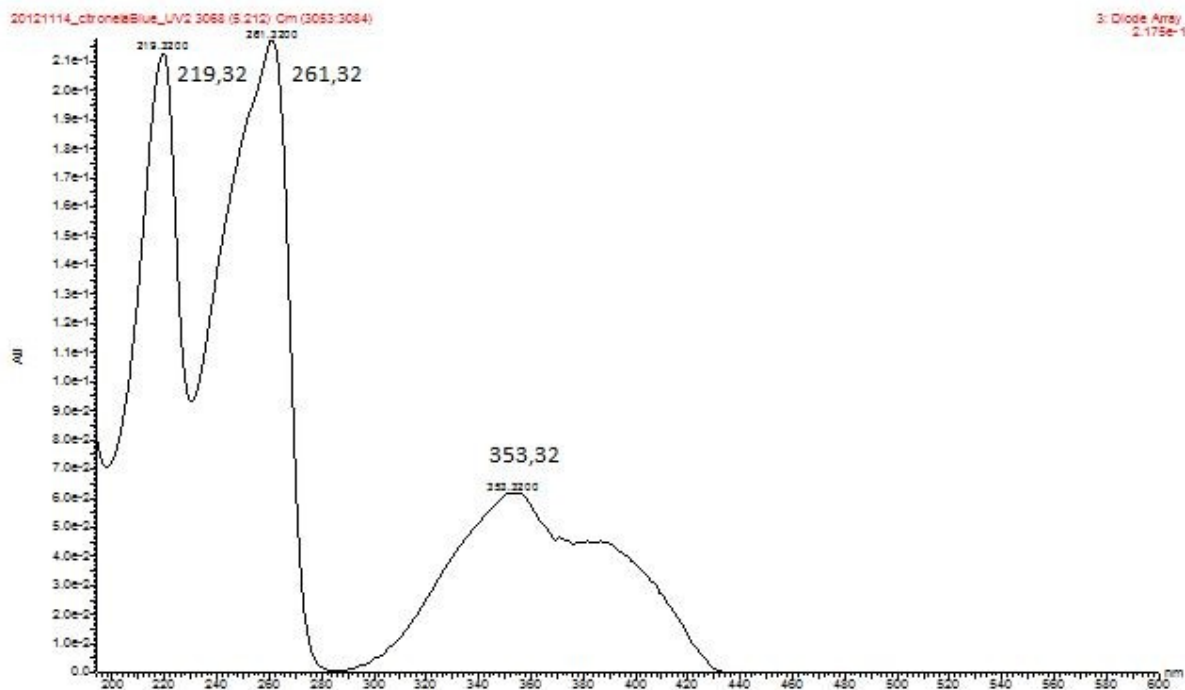
5.4 UPLC

(vzorky byly zpracovány RNDr. Terezou Tylovou, PhD.)

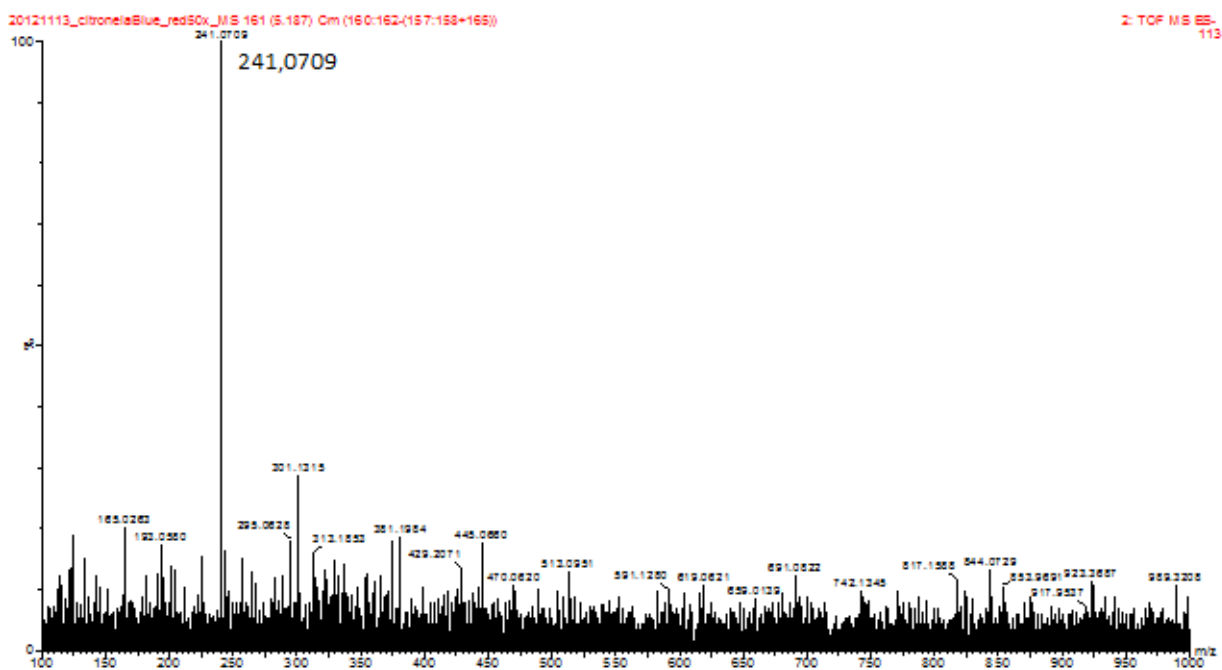
Na UPLC byly měřeny vzorky V14 a V17 získané ze semipreparativního HPLC, podmínky uvedené v kapitole 4.10. Z UV-VIS spektra (viz. Obr. 21) vzorku V17 jsou patrná tři vlnová maxima (219, 261 a 353 nm). Hmotnostní spektrum standardu (viz. Obr. 22, 23) bylo naměřeno v záporném i kladném módu, neutrální molekulovou hmotnost měl 242,07. Vzorek V14 měl dvě vlnová maxima 260 a 444 nm a v negativním iontovém módu molekulovou hmotnost 922,32.



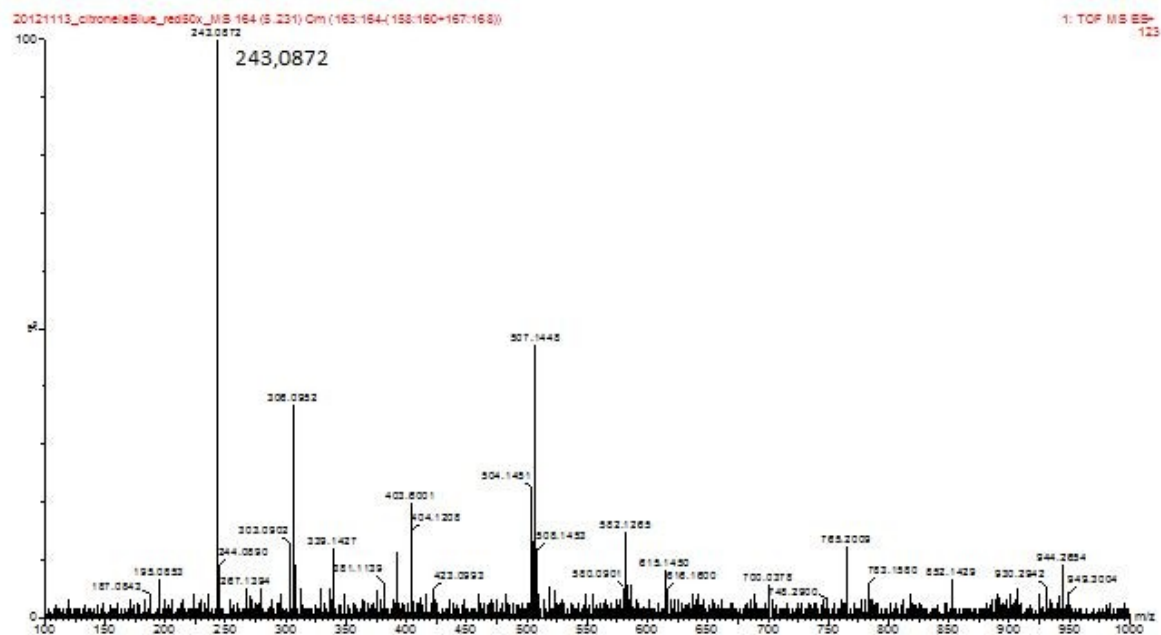
Obr. 20 – UPLC/DAD/TOF-MS analýza vzorku V17. Záznam z DAD detektoru (nahore), záznam celkového iontového proudu v negativním ionizačním módu (uprostřed), záznam celkového iontového proudu v pozitivním ionizačním módu (dole). Chromatografické podmínky: kolona UPLC BEH C18 (1,7 μ m, 50 mm x 2,1 mm, Waters, ČR), průtok 0,4 ml/min, gradientová eluce: 95 % A (CHOOH v H₂O, 0,1 : 99,9 (v/v)) a 5 % B (ACN), za 10 minut lineárně dosáhl 70 % A, detekce UV-VIS v rozsahu vlnových délek od 200 do 600 nm.



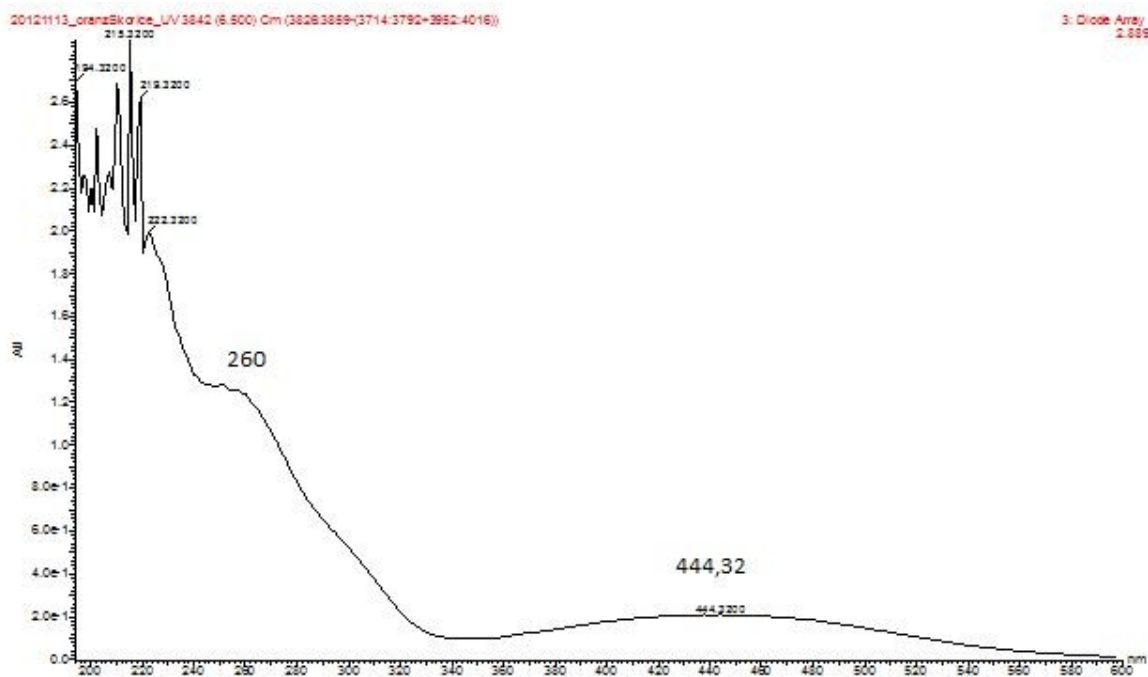
Obr. 21 – UV/VIS spektrum vzorku V17, podmínky měření viz. Obr. 20.



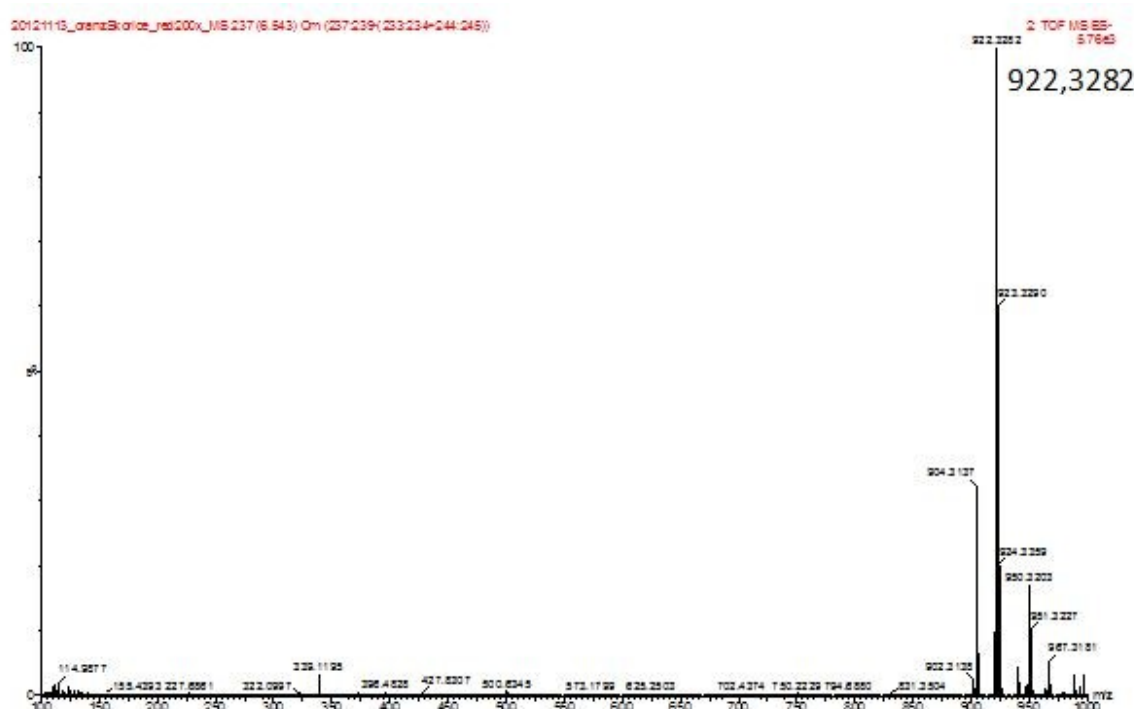
Obr. 22 – Hmotnostní spektrum v negativním iontovém módu vzorku V17, podmínky měření viz. Obr. 20.



Obr. 23 – Hmotnostní spektrum v pozitivním iontovém módu vzorku V17, podmínky měření viz. Obr. 20.



Obr. 24 – UV-VIS spektrum vzorku V14, podmínky měření viz. Obr. 20.

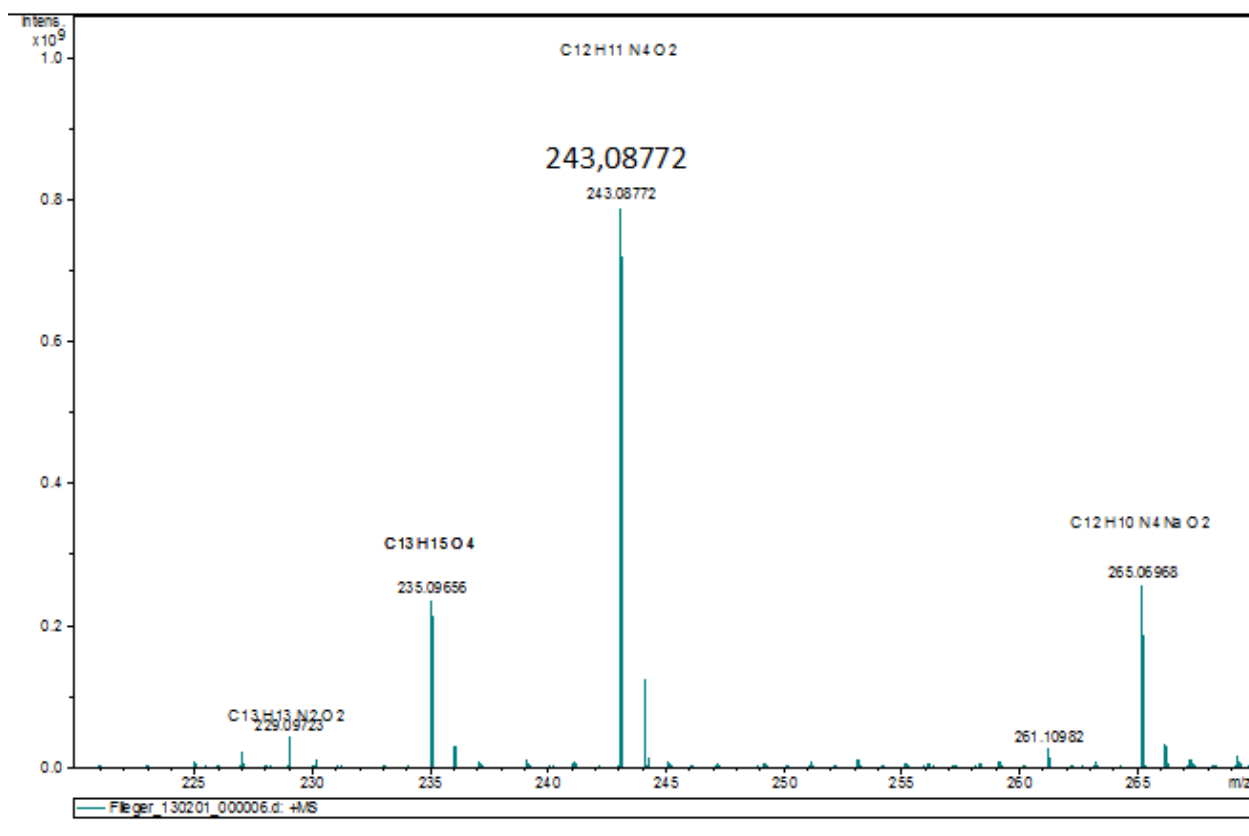


Obr. 25 – Hmotnostní spektrum v negativním iontovém módu, vzorku V14, podmínky měření viz. Obr. 20.

5.5 FTMS

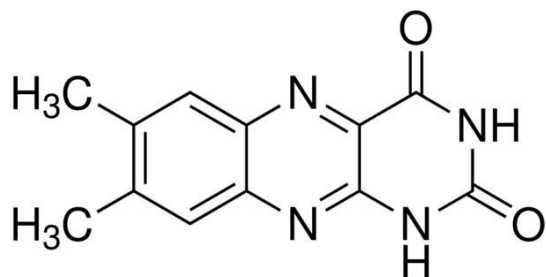
(vzorky byly zpracovány RNDr. Petrem Novákem, Ph.D.)

Z hmotnostní detekce metodou Fourierovy transformační hmotnostní spektrometrie (FTMS) bylo zjištěno hmotnostní spektrum (viz. Obr. 26) a molekulová hmotnost látky V17, z které byl stanoven sumární vzorec $C_{12}H_{10}N_4O_2$. Podmínky měření uvedeny v kapitole 4.11. V programu SciFinder byla podle sumárního vzorce zjištěna pouze jediná přírodní sloučenina – lumichrom - se stejnou molekulovou hmotností 242 a stejným sumárním vzorcem. Na rozdíl od vzorku V17 má odlišná absorpční maxima (350 a 392 nm) v UV-VIS spektru a jinou barevnost. Na základě těchto zjištěných skutečností můžeme předpokládat, že se pravděpodobně jedná o jinou látku než lumichrom.[27]

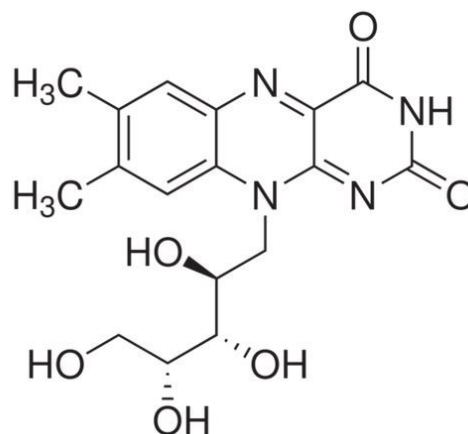


Obr. 26 – FTMS hmotnostní spektrum vzorku V17, podmínky měření: Izolace prováděna v plynné fázi s 4,0 a.m.u. okně, s kolizní energií -11 V, v prekurzoru iontu 243,5 m/z.

Riboflavin (viz. Obr. 28) je přírodní barvivo, žluto oranžové barvy. Jeho struktura je tvořena jádrem z isoalloxazinového heterocyklu a cukru ribitolu. Ve vodě je pouze slabě rozpustný, je odolný vůči vysokým teplotám. Rozkládá se působením světla na lumichrom (viz. Obr. 27), který patří do skupiny alloxazinů. Na rozdíl od vzorku V17 má však jiné zabarvení a fluoreskuje.[27]



Obr. 27 - Strukturní vzorec lumichromu.
(převzato od Sigma-Aldrich)

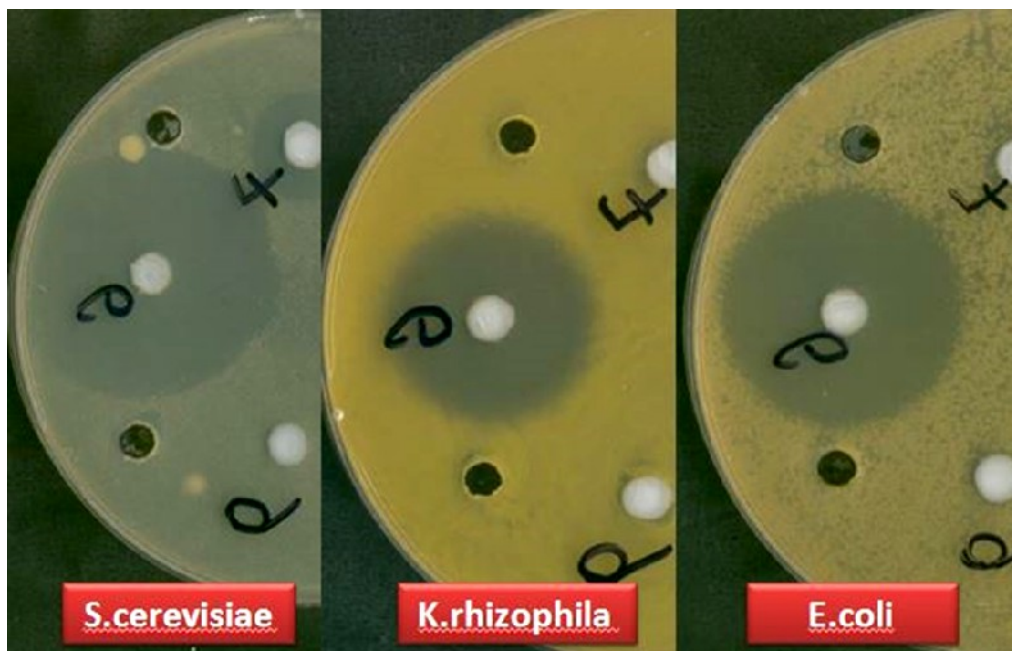


Obr. 28 – Strukturní vzorec riboflavinu.
(převzato od Sigma-Aldrich)

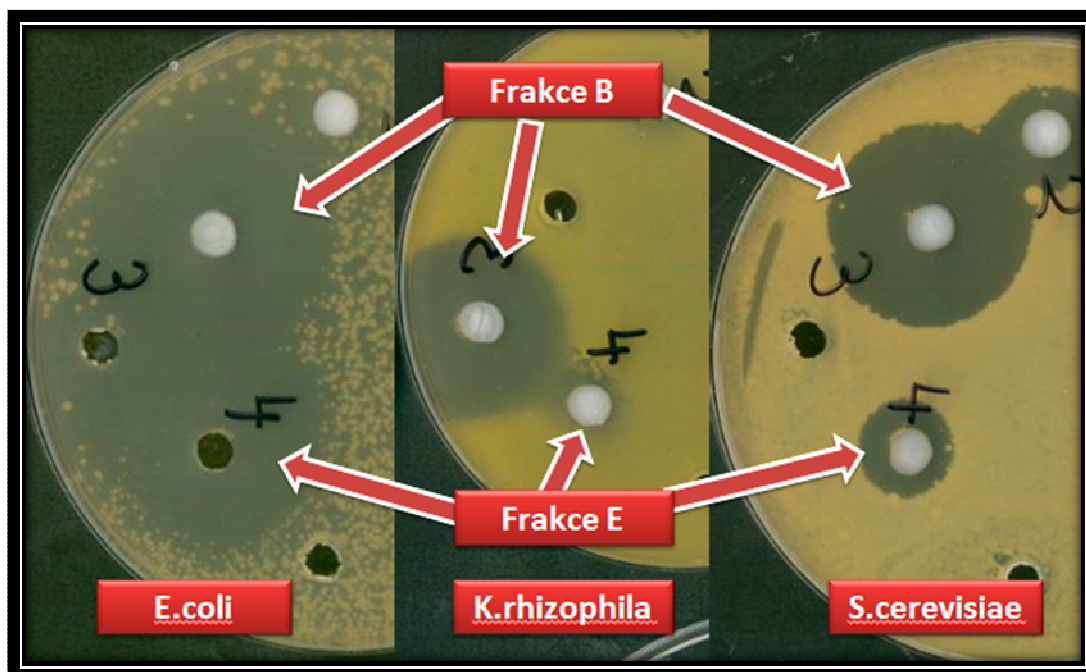
5.6 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivity byly prováděny proti třem různým mikrobiálním kulturám (viz. kapitola 4.13) - *Escherichia coli* (G⁻), *Saccharomyces cerevisiae* a *Kocuria rhizophila* (G⁺). Inhibiční zóny byly pozorovány pouze u toluenových extraktů z mycelu (viz. obr. 29). U kontrolních jamek (rozpouštědlo) nebyly zóny zjištěny. Toluénové extrakty byly dále zpracovány metodou SPE Si. U získaných frakcí A-E byly pozorovány inhibiční zóny (viz. obr. 30) proti všem testovaným mikrobiálním kulturám. Frakce C byla dále dělena na flash chromatografii (viz. kapitola 4.12.2), přičemž látka C5 („růžová“) nevykazovala žádnou antimikrobiální aktivitu na rozdíl od frakce C17 („žlutá“) viz. obr. 31.

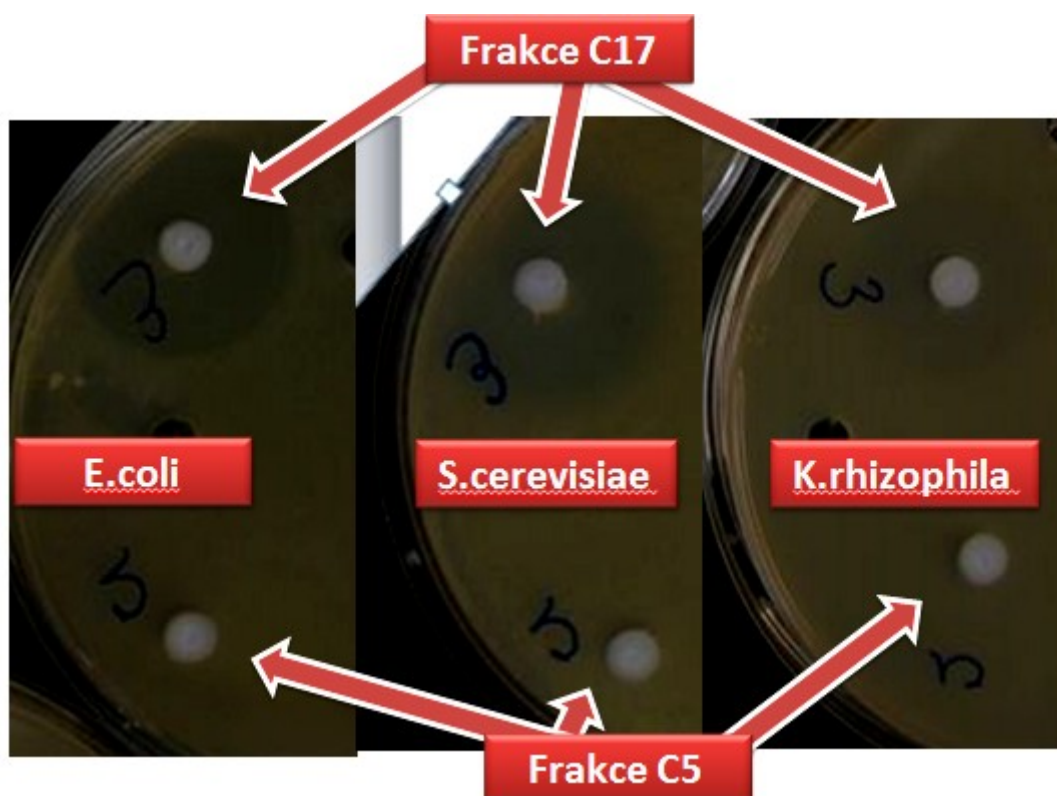
Extrakty dichlormethanové a ethylacetátové (s 3% AA) připravené z fermentačního roztoku byly biologicky aktivní pouze na agaru se zaočkovanou bakterií *Kocuria rhizophila* (viz. obr. 32).



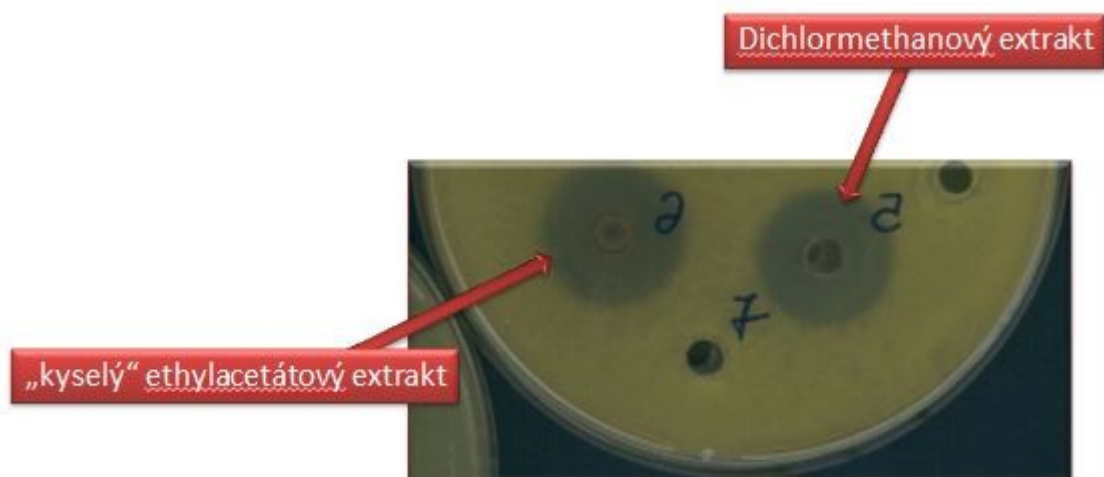
Obr. 29 – Antimikrobiální aktivita toluenového extraktu získaného z mycelia, inhibiční zóny kolem čísla 6 u všech testovaných mikrobiálních kultur.



Obr. 30 – Antimikrobiální aktivita vybraných frakcí B a E získaných metodou SPE Si z toluenového extraktu mycelia.



Obr. 31 – Antimikrobiální aktivita frakcí C5 a C17 získaných z flash chromatografie.



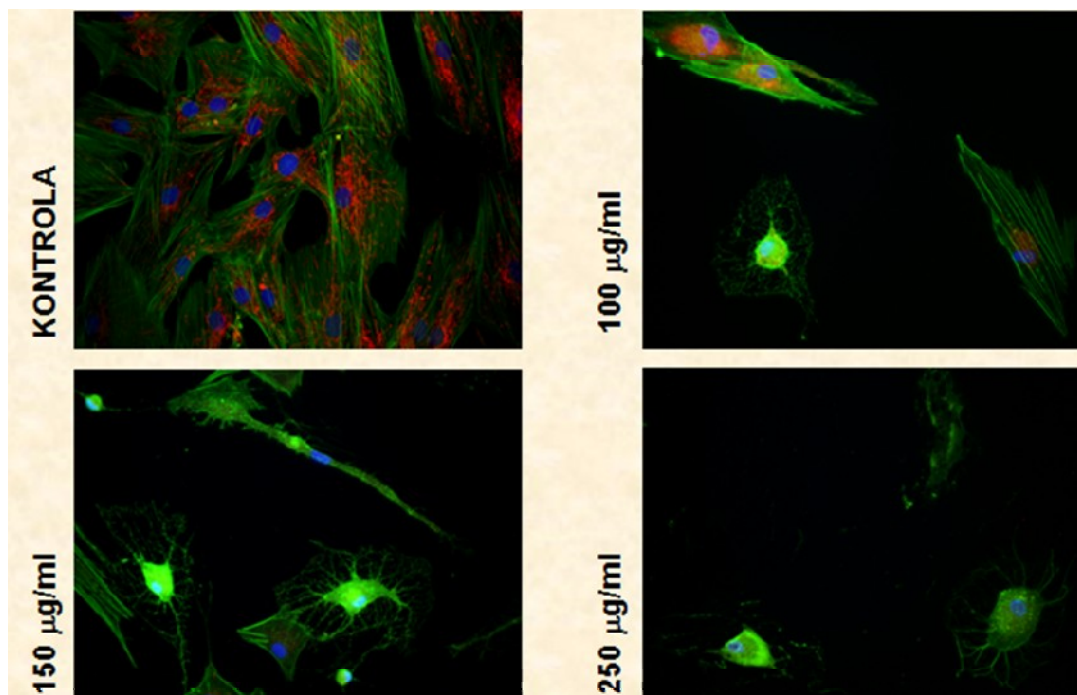
Obr. 32 – Antimikrobiální aktivita extraktů získaných z fermentačního média pouze na agaru se zaočkovanou baktérií *Kocurie rhizophila*.

5.7 Testování aktivity na lidských kožních fibroblastech a buňkách HeLa

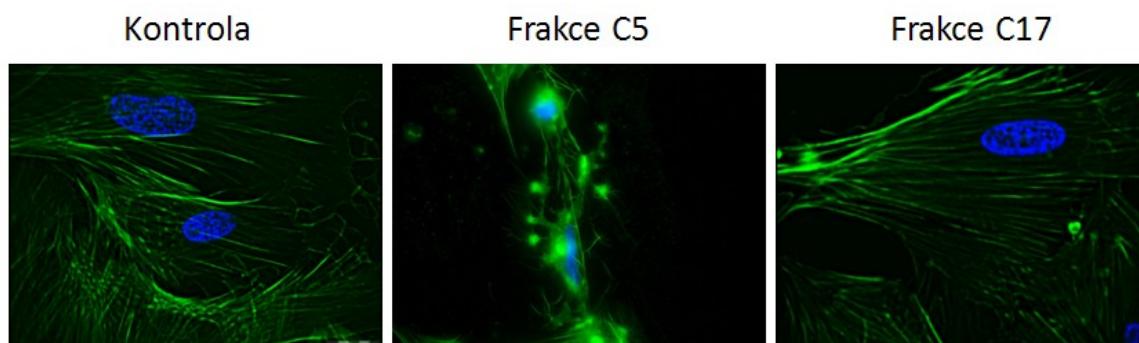
Toluenový extrakt z mycelu a vypreparované vzorky C5 a C17 z flash chromatografie byly testovány na katedře Buněčné biologie PřF UK u doc. RNDr. Jana Černého Ph.D. na kožních fibroblastech a HeLa buňkách.

Aktivita hrubého toluenového extraktu (viz. obr. 33) byla velmi podobná jako u frakce C5 „růžová“ (viz. obr. 34). Naopak frakce C17 „žlutá“ (viz. obr. 33) neměla žádný vliv jak na lidské kožní buňky, tak na HeLa buňky.

Buňky ztrácely adhezi a aktinový cytoskelet byl dramaticky remodelován (viz. obr. 33,34). Tato skutečnost by mohla vysvětlovat možnou patogenesi onemocnění WNS tj. ztráta funkce dermálních fibroblastů zodpovědných za produkci kožní mezibuněčné hmoty s následnou ztrátou mechanické odolnosti a zvýšení prostupnosti pro další patogeny.



Obr. 33 - Testování hrubého toluenového extraktu z mycelu na kožních buňkách. Použité koncentrace toluenového extraktu jsou uvedené vlevo u obrázků. Zeleně je zbarven aktinový cytoskelet, červeně mitochondrie a modře jádra. Podmínky měření uvedeny v kapitole 4.14.



Obr. 34 - Testování frakcí C5 a C17 získaných z flash chromatografie z hrubého toluenového extraktu z mycelu na kožních buňkách. Vzorky byly rozpuštěny ve 20 mikrolitrech DMSO, pro testování bylo použito 5 mikrolitrů roztoku na 1ml tkáňového média. Zeleně je zbarven aktinový cytoskelet a modře jádra. Podmínky měření uvedeny v kapitole 4.14.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá studiem sekundárních metabolitů produkovaných houbou *Geomyces destructans*, kmen CCF 3941, která způsobuje u netopýrů onemocnění tzv. Syndrom bílého nosu.

Z emerzní kultivace houby *G. destructans* byly extrakcí rozpouštědly s různou polaritou připraveny surové extrakty a to jak z biomasy, tak i z fermentační tekutiny. Hrubé extrakty byly dále purifikovány různými chromatografickými metodami. Z fermentační tekutiny byly izolovány dva metabolity (V14 a V17) a z houbové biomasy dvě hlavní látky C5 a C17.

Sekundární metabolit V17 má tři absorpční maxima (219, 261 a 353 nm), molekulovou hmotnost 242 Da a sumární vzorec $C_{12}H_{10}N_4O_2$. V programu SciFinder byla podle sumárního vzorce zjištěna pouze jediná přírodní sloučenina – lumichrom - se stejnou molekulovou hmotností 242 a stejným sumárním vzorcem. Na rozdíl od vzorku V17 má odlišná absorpční maxima (350 a 392 nm) a jinou barevnost. Na základě těchto zjištěných skutečností můžeme předpokládat, že se pravděpodobně jedná o jinou látku než lumichrom. Pro zjištění struktury látky V17 bude nutné vzorek dále analyzovat metodou NMR a nebo X-Ray.

U druhého metabolitu V14 byla zjištěna absorpční maxima 260 a 444 nm a molekulová hmotnost 922 (v negativním iontovém módu). Zjištění struktury látky V14 metodou NMR bylo neúspěšné a to z důvodu jeho nedostatečného množství.

Z houbové biomasy byly izolovány dvě hlavní látky C5 a C17. Vzhledem k tomu, že nebyly rozpustné v polárnějších rozpouštědlech např. EtAc nebo CH_3OH , nebylo možné jako v případě výše popsaných metabolitů použít RP-HPLC pro jejich izolaci.

Toluenové extrakty z houbové biomasy a z nich získané frakce A-E, C17 vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným mikrobiálním kulturám tj. *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* a *Kocuria rhizophila*. Navíc toluenový extrakt z biomasy *G. destructans* a z něho izolovaná frakce C5 vykazovaly na lidských kožních buňkách a také na Hela buňkách velmi podobnou biologickou aktivitu. Buňky ztrácely adhezi a jejich aktinový cytoskelet byl remodelován.

Antimikrobiální aktivita byla dále pozorována u dichlormethanových a ethylacetátových extraktů získaných z fermentačního média pouze proti baktérii *Kocuria rhizophila*.

Na základě výše zjištěných skutečností můžeme spekulovat, že díky nefunkčnosti buněčné adheze a přestavění mezibuněčného cytoskeletu dochází ke ztrátě funkce dermálních fibroblastů a tím k narušení mechanické odolnosti (vytvoření otevřených nehojících se ran) a zvýšení možnosti sekundární infekce dalšími patogeny přítomnými na zimovištích netopýrů během jejich hibernace.

7 Použitá literatura

1. Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V. and Schountz T., Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, num. 3, p. 531-545, 2006
2. Chaturvedi V., Springer D.J., Behr M.J., Ramani R., LiX., Peck M.K., Ren P., Bopp D.J., WoodB., Samsonoff W.A., Butchkoski C.M., Hicks A.C., Stone W.B., Rudd R.J. and Chaturvedi S., Morphological and Molecular Characterization of Psychrophilic Fungus *Geomyces destructans* from New York Bats with White Nose Syndrome (WNS), vol. 5, p. 1-15, 2010
3. Jonasson K.A. and Willis C.K.R., Changes in Body Condition of Hibernating Bats Support the Thrifty Female Hypothesis and Predict Consequences for Population with White-Nose Syndrome, *PLoS ONE* 6(6), 2011
4. Gargas A., Trest M.T., Christensen M., Volk T.J., Blehert D.S., *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome, *Mycotaxon*, vol. 108, p. 147 – 154, 2009
5. Weitzman I. and Summerbell R.C., The Dermatophytes, *Clinical Microbiology Reviews*, p. 240-259, 1995
6. Clayton Y.M., Dermaphyte infections, *Postgard Medical Journal* 55, p. 605-607, 1979
7. Puechmaille S.J., Verdeyroux P., Fuller H., Gouilh M., Bekaert M., Teeling E.C., White-Nose Syndrome Fungus (*Geomyces destructans*) in Bat, France, *Emerging Infectious Disease Journal*, vol. 16, num. 2, 2010
8. Blehert D.S., Lorch J.M., Ballmann A.E., Cryan P.M. and Meteyer C.U., Bat White-Nose Syndrome in North America, *Microbe*, vol. 6, num. 6, 2011
9. Wibbelt G., Kurth A., Hellmann D., Weishaar M., Barlow A., Veith M., Pruger J., Gorfol T., Groshe L., Bontadina F., Zophel U., Seidl H.P., Cryan P.M. and Blehert D.S., White-Nose Syndrome Fungus (*Geomyces destructans*) in Bats, Europe, *Emerging Infection Diseases Journal*, vol. 16, num. 8, 2010
10. Foley J., Clifford D., Castle K., Cryan P. and Ostfeld R.S., Investigating and Managing the Rapid Emergence of White-Nose Syndrome, a Novel, Fatal, Infectious Deasease of Hibernating Bats, *Conservation Biology*, vol. 25, num. 2, p. 223-231, 2010
11. Ohari T., Inoue I., Namiki F., Kunoh H. and Tsuge T., REN1 Is Reuired for Development of Microconidia and Macroconidia, but Not of Chlamydospores, in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*, Nagoya University, Copyright by Genetics Society of America, 2003
12. Keller N.P., Turner G. and Bennett J.W., Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics, *National Review Microbiol* 3, p. 937-947, 2005
13. Bérdy J., Bioactive Microbial Metabolites, *Journal of Antibiotics*, 58(1), p. 1-26, Japan, 2005
14. Pittet A., Modern methods and trends in mycotoxin analysis, Nestlé Reasearch Centre, Mitt. Lebesm, *Journal of Hygiene* 96, p. 424-444, 2005
15. Kokkonen M, The challenge of LC/MS/MS multi-mycotoxin analysis, Academic dissertation, permission of the Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinky, 2011
16. van Egmond H.P. and Paulsch W.E., Determination of mycotoxins, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 58, num. 2, p. 315-326, 1986

17. Cigic I.K. and Prosen H., An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of mycotoxins, *International Journal of Molecular Sciences* 10, p. 62-115, 2009
18. Zwir A. and Biziuk M., Solid Phase Extraction Techniue – Trends, Opportunities and Applications, *Polish Journal of Environment Studies*, vol. 15, num. 5, p. 677-690, 2006
19. Kupiec T., Quality-Control Analytic Methods: High-Performance Liquid Chromatography, *International Journal of Pharmaceutic Compounding*, vol. 8, num. 3, May 2004
20. Kazakevich Y. and Lobrutto R., *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 2007
21. Patil V.P., Tathe R.D., Devdhe S.J., Angadi S.S. and Kale S.H., Ultra Performance Liquid Chromatography: a review, *International Reasearch Journal of Pharmacy* vol. 2, num. 6, p. 39-44, 2011
22. van Bramer S.E., *An Introduction to Mass Spectrometry*, Department of Chemistry, Chester, 1997
23. Upstone S.L., Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (Meyers R.A.), p. 1699-1714, 2000
24. Schmid F.X., *Biological Macromolecules UV-visible Spectrophotometry*, University of Bayreuth, Germany, 2001
25. Katzen R., Madson P.W. and Moon G.D., Ethanol distillation: the fundamentals, KATZEN International, Inc., Cincinnati, Chapter 18, p. 270-288, USA, 1995
26. Gude V.G., Nirmalakhandan N., Deng S. and Maganti A., Feasibility study of new two-stage low temperature desalination proces, *Energy Conversion and Managment* 56, p. 192-198, 2012
27. Sikorski M., Sikorska E., Worrall D.R. and Wilkinson F., The efficiency of singlet oxygen generation by alloxazine and lumichrome, Faculty of Chemistry, Mickiewicz University